

Université de Montréal

**Caractérisation et manipulation des destins cellulaires induits par les
traitements du cancer de la prostate**

Par
Arthur Vancayseele

Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biologie Moléculaire, option générale

Mai 2020

© Arthur Vancayseele, 2020

Résumé

La sénescence cellulaire est un mécanisme naturel de suppression tumorale défini par un arrêt stable de la prolifération. Bien que presque toujours mutées dans au moins une des voies déclenchant la sénescence (ex : p53/p21 ou p16/Rb), les cellules cancéreuses conservent souvent la capacité d'y entrer en réponse au traitement. Cette sénescence induite par la thérapie (SIT) peut être ciblée pharmacologiquement pour en renforcer les effets positifs. Une approche émergente consiste à combiner un traitement anticancéreux induisant la sénescence à un sénolytique, agent éliminant spécifiquement les cellules sénescents. Dans le contexte du cancer de la prostate (CP), différents types de SIT ont déjà été observées dans de multiples modèles exposés à différents traitements. Cependant, le manque de données comparant ces phénotypes souligne le besoin d'analyses plus systématiques. De plus, la sensibilité aux sénolytiques des cellules du CP en état de SIT n'a pas encore été évaluée dans ces contextes. Dans cette étude, nous avons évalué les destins cellulaires des lignées du CP après exposition à trois traitements pertinents au niveau clinique : l'irradiation et l'olaparib, deux inducteurs de dommages à l'ADN et l'enzalutamide, un anti-androgène. Dépendamment de la lignée, les traitements par irradiation et olaparib ont mené à une réponse dirigée principalement vers la sénescence ou vers une réponse mixte de mort cellulaire, de catastrophe mitotique et de sénescence. Dans tous les cas, ceux-ci ont déclenché un phénotype sénescents classique et convertible en mort cellulaire par des sénolytiques inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille Bcl-2. D'autre part, le traitement à l'enzalutamide a déclenché un phénotype semblable à la sénescence se distinguant par sa réversibilité, son absence de dommages à l'ADN et son insensibilité à ces mêmes sénolytiques. Globalement, nos résultats soulignent l'importance du contexte thérapeutique dans l'élaboration des stratégies de manipulation de la SIT du CP. Ils constituent également une justification robuste à l'étude préclinique des traitements combinant la radiothérapie ou l'olaparib à des inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille Bcl-2 dans le contexte du CP.

Mots-clés : sénescence, cancer de la prostate, olaparib, radiothérapie, enzalutamide, sénolytiques

Abstract

Cellular senescence is a natural tumor suppression mechanism defined by a stable proliferation arrest. Although almost always mutated in at least one of the senescence pathway genes (e.g., p53/p21 or p16/Rb), cancer cells often retain the ability to become senescent in response to treatment. This therapy-induced senescence (TIS) can be pharmacologically targeted to enhance its positive effects. An emerging approach is to combine senescence-inducing cancer treatment with senolytics, compounds that specifically eliminate senescent cells. In the context of prostate cancer (PCa), different types of TIS have already been observed in multiple models exposed to different treatments. However, the lack of data comparing these phenotypes highlights the need for more systematic analyses. In addition, the senolytic sensitivity of TIS PCa cells has not yet been evaluated in these settings. In this study, we evaluated the cell fates of PCa cell lines after exposure to three clinically relevant treatments: irradiation and olaparib, two DNA damage inducers, and enzalutamide, an anti-androgen. Depending on the cell line, irradiation and olaparib treatments led to a response mainly directed towards senescence or toward a mixed response of cell death, mitotic catastrophe and senescence. In all cases, these treatments triggered a classic senescent phenotype that was convertible to cell death by senolytic inhibitors of the Bcl-2 family antiapoptotics. On the other hand, treatment with enzalutamide triggered a senescence-like phenotype, distinguishable by its reversibility, absence of DNA damage and insensitivity to these same senolytics. Overall, our results underscore the importance of the therapeutic context in the development of PCa-TIS manipulation strategies. They also provide a robust rationale for the preclinical study of treatments that combine radiotherapy or olaparib with Bcl-2 family antiapoptotic inhibitors in the PCa context.

Key words: senescence, prostate cancer, olaparib, radiotherapy, enzalutamide, senolytics

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	13
Liste des sigles et abréviations.....	15
Remerciements.....	21
Chapitre 1 – Introduction.....	23
1) La sénescence cellulaire.....	23
1.1) Définition et historique.....	23
1.2) Le phénotype sénescents.....	23
a) L'arrêt prolifératif associé à la sénescence (APAS).....	23
b) L'augmentation de l'activité SA β -galactosidase.....	26
c) Changements morphologiques.....	26
d) Persistance de la réponse aux dommages à l'ADN.....	26
e) Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (PSAS).....	29
f) La résistance à l'apoptose associée à la sénescence (RAAS).....	29
1.3) Les mécanismes déclenchant la sénescence.....	30
a) Généralités.....	30
b) La sénescence répllicative.....	31
c) La sénescence prématurée induite par un stress (SPIS).....	31
d) La sénescence développementale programmée.....	32

1.4)	Importance physiologique et physiopathologique de la sénescence cellulaire.....	33
a)	La sénescence : une barrière à la transformation néoplasique également impliquée dans de multiples processus physiologiques et physiopathologiques	33
b)	Implication dans la cicatrisation.....	35
c)	Implication dans les pathologies liées au vieillissement.....	35
d)	Les sénolytiques	36
e)	Influence du PSAS sur la progression tumorale : généralités	37
2)	Le cancer de la prostate : du diagnostic au traitement	37
2.1)	Généralités	37
2.2)	Du cancer localisé hormonosensible au cancer métastatique hormonorésistant	38
2.3)	Diagnostic et stratification des risques.....	39
a)	Le toucher rectal et l'antigène prostatique spécifique	39
b)	Le grade du cancer de la prostate.....	40
f)	Le stade du cancer de la prostate : classification TNM.....	40
g)	Cancer localisé : stratification des risques et choix thérapeutique	41
2.4)	Les différents modèles <i>in vitro</i>	42
a)	Les LNCaP	42
b)	Les PC-3	42
3)	Le traitement du cancer de la prostate.....	43
3.1)	Les hormonothérapies	43
a)	Les traitements par privation androgénique (TPA).....	43
b)	Les anti-androgènes (AA)	44
3.2)	La radiothérapie	44
3.3)	Les chimiothérapies cytotoxiques	45

3.4) L'immunothérapie.....	45
3.5) Les inhibiteurs des PARPs : une chimiothérapie émergente.....	46
4) Les destins cellulaires induits par la thérapie anticancéreuse.....	47
4.1) La mort cellulaire	48
a) L'apoptose.....	48
b) Distinction des différents modes de mort cellulaire.....	50
4.2) La catastrophe mitotique.....	50
4.3) La sénescence induite par la thérapie (SIT)	51
a) SIT et arrêt prolifératif associé à la sénescence (APAS).....	51
b) Les sénolytiques dans le ciblage de la SIT	52
5) La sénescence cellulaire et le cancer de la prostate.....	53
5.1) La sénescence induite par les traitements du cancer de la prostate	53
5.2) Influence de la sénescence dans la progression du cancer de la prostate.....	54
Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs	57
1) Prémisses	57
2) Problématique.....	57
3) Objectifs	58
Chapitre 3 – Résultats expérimentaux : article - Cells, MDPI	59
1. Introduction.....	60
2. Materials and Methods.....	61
3. Results	63
4. Discussion.....	72
Supplementary Materials	73
Supplementary figure 1	74

Supplementary figure 2.....	75
Supplementary figure 3.....	76
Supplementary figure 4.....	77
Supplementary figure 5.....	78
Supplementary figure 6.....	79
Supplementary Table 1.....	80
Author Contributions	81
Funding.....	81
Acknowledgments	81
Conflicts of Interest	81
References.....	81
Chapitre 4 – Discussion	93
1) Destins cellulaires provoqués par les traitements induisant des dommages à l’ADN	93
2) La sénescence induite par le traitement à l’enzalutamide	95
3) Manipulation de la sénescence induite par les traitements du cancer de la prostate	98
Chapitre 5 – Conclusions et perspectives	105
1) Conclusions.....	105
2) Perspectives	105
Références bibliographiques.....	109
Annexe.....	144

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Systèmes de stratification des risques pré-traitement.	41
---------------------	--	-----------

Liste des figures

Figure 1. – Déclencheurs et inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire.	24
Figure 2. – La réponse aux dommages à l'ADN.	28
Figure 3. – Déclencheurs de la sénescence et voies effectrices.....	30
Figure 4. – La sénescence cellulaire est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques.	34
Figure 5. – Développement clinique du cancer de la prostate et traitements associés.	38
Figure 6. – Destins cellulaires induits par les thérapies anticancéreuses.	47
Figure 7. – Mécanismes de l'apoptose induite par p53 via la voie intrinsèque.	49

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

APAF-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1 (facteur d'activation des peptidases apoptotiques 1)

APAS : Arrêt prolifératif associé à la sénescence

APS : Antigène prostatique spécifique

ARF : Alternate reading frame (cadre de lecture alternatif)

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATF6 α : Activating transcription factor 6 α (Facteur de transcription activateur 6 α)

ATM : Ataxia telangiectasia mutated protein (protéine d'ataxie télangiectasie mutée)

ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (protéine liée à Rad3 et à l'ataxie télangiectasie)

ATRIP : ATR-interacting protein (protéine interagissant avec ATR)

BAD : Bcl-2 associated agonist of cell death (agoniste de mort cellulaire associé à Bcl-2)

BAK : Bcl-2 homologous antagonist/killer (tueur/antagoniste homologue des Bcl-2)

BAX : Bcl-2 associated X, apoptosis regulator

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2 (lymphome à cellule B-2)

Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large (lymphome à cellules B extra-large)

BID : BH3 interacting-domain death agonist (agoniste de mort à domaine interagissant avec BH3)

BIM : Bcl-2 interacting mediator of cell death (Médiateur de mort cellulaire interagissant avec Bcl-2)

BRCA 1/2 : Breast cancer type 1 susceptibility protein 1/2 (Protéine de susceptibilité au cancer du sein de type 1/2)

Cas9 : CRISPR associated protein 9 (protéine associée aux CRISPR 9)

CBX7 : Chromobox homolog 7

CDB : Cassure double-brin

CDK : Cyclin-dependant kinase (kinase cycline-dépendante)

CDKI : Cyclin-dependant kinase inhibitor (inhibiteur de kinase cycline-dépendante)

CHK1/2 : Checkpoint kinase 1/2 (Kinase de point de contrôle 1/2)

CM : Catastrophe mitotique

CP : Cancer de la prostate

CPm : Cancer de la prostate métastatique

CPRC : Cancer de la prostate résistant à la castration

CPSC : Cancer de la prostate sensible à la castration

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées)

CSB : Cassure simple-brin

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA SCARS : DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence (segments d'ADN avec altérations de la chromatine renforçant la sénescence)

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

FDA : Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux)

FOXO : Forkhead box (« domaine à tête de fourche »)

GG : Groupe de grade

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages)

HPrEC : Human prostatic epithelial cells (cellules épithéliales prostatiques humaines)

Hsp : Heat shock protein (protéine de choc thermique)

IGFBP-2 : Insulin-like growth factor-binding protein 2 (Protéine 2 de liaison au facteur de croissance semblable à l'insuline)

IL : Interleukine

Jak2 : Janus kinase 2

LH : Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)

LHRH : Luteinizing hormone releasing hormone (hormone de libération de l'hormone lutéinisante)

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1 (Leucémie à cellules myéloïdes 1)

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1 (Protéine chémoattractante monocyttaire 1)

MDC-1 : Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (Protéine 1 médiatrice du point de contrôle des dommages à l'ADN)

Mdm2 : Murine double minute 2

MMP : Matrix metalloproteinase (métalloprotéase matricielle)

MRE11 : Meiotic recombination 11 homolog (homologue de la protéine de recombinaison méiotique 11)

mTOR : Mechanistic target of rapamycin (cible mécanistique de la rapamycine)

NBS1 : Nijmegen breakage syndrome protein 1 (protéine 1 du syndrome de Nimègue)

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PARPi : Inhibiteur des poly(ADP-ribose) polymérase

PCR : Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PDGF : Platelet-derived growth factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes)

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PML : Promyelocytic leukemia (leucémie promyélocytaire)

PPL : Piperlongumine

pRb : Protéine du rétinoblastome

PSAS : Phénotype sécrétoire associé à la sénescence

PTEN : Phosphatase and tensin homologue (homologue de la tensin et de la phosphatase)

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis (modulateur de l'apoptose régulé à la hausse par p53)

RA : Récepteur aux androgènes

RDA : Réponse aux dommages à l'ADN

RPA : Replication protein A (protéine de réplication A)

SA β -gal : Senescence-associated β -galactosidase (β -galactosidase associée à la sénescence)

SIT : Sénescence induite par la thérapie

SPIS : Sénescence prématurée induite par le stress

Stat3 : Signal transducer and activator of transcription 3 (transducteur de signal et activateur de transcription 3)

T : Testostérone

TGF- β : Transforming growth factor β (facteur de croissance transformant β)

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor (récepteur du facteur de nécrose tumorale)

TNM : Tumeur, nœud lymphatique, métastase

TPA : Traitement par privation androgénique

VEGF : Vascular endothelial growth factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

XDP : Xénogreffes dérivées de patients

Remerciements

Merci Guila pour le partage de ton expertise sur le cancer de la prostate et pour l'aide considérable que tu m'as apporté dans mon projet professionnel.

Merci Nico pour la formation scientifique de pointe et pour les débats sur la fin de Game of Thrones lors des diners.

Merci Sophie pour avoir gardé ton calme quand j'apportais mes échantillons 1h en retard ou quand j'avais compromis tes scans à l'Incucyte.

Merci MAO pour le partage de ton excellence scientifique, les nombreux services que tu m'as généreusement rendu et pour les discussions philosophiques sur la sénescence cellulaire.

Merci Guillaume pour ton expertise, ta fiabilité et pour m'avoir montré ton imitation de l'accent des gens du sud de la France qui jouent à la pétanque au parc Jarry.

Merci Isabelle pour ta générosité et ton sourire à toute épreuve.

Merci Richard pour avoir toujours pu apporter ton aide précieuse à temps quand j'évoluais dans les tréfonds de la jungle administrative.

Merci Daméhan pour la tête que tu as faite quand on est arrivé dans la chambre du Jail Hostel d'Ottawa pour la CCRC. Merci pour m'avoir initié à la sapologie.

Merci Zakia pour les nombreuses conversations sur la vie, sur Fortnite et sur l'Algérie.

Merci Yu pour m'avoir aidé à pratiquer mon anglais et bonne chance pour apprendre le français et ses noms communs genrés.

Merci Tibila pour m'avoir permis de relativiser quand je me disais que je travaillais trop.

Merci Francis pour ta générosité, ta passion pour la science et pour ton optimisme contagieux.

Merci pour ta confiance car, grâce à elle, j'ai enfin pu me dépasser et me prouver mon potentiel.

Merci Monique, Sarah, Alizée, Sinthuya, Véronique et Stéphanie. Merci pour ces brunches, restaus, pique-niques et cabanes à sucres. Merci pour cette stimulation intellectuelle permanente. Merci pour ce fantastique party de Noël avec open-bar (!). Merci pour ces matchs de volley et de soccer dans l'herbe.

Chaque fin est un commencement. Aujourd'hui, je dis au revoir à ma famille d'accueil et je tourne la page de ma première aventure au Québec. J'ai déjà hâte de découvrir la suivante.

Chapitre 1 – Introduction

1) La sénescence cellulaire

1.1) Définition et historique

La sénescence cellulaire se caractérise par un arrêt prolifératif stable en présence de facteurs de croissance [1]. Elle a été initialement découverte en 1961 par Leonard Hayflick et Paul S. Moorhead, lorsque ceux-ci ont observé que les cellules dérivées de tissus fœtaux humains n'étaient plus capables de proliférer après un nombre limite de passages situé autour de 50 [2]. Bien que la sénescence ait été découverte il y a une soixantaine d'années, les caractérisations majeures de son phénotype ont réellement débuté dans les années 1990, date à partir de laquelle son induction a été décrite comme dépendante du raccourcissement des télomères [3-5], de l'expression anormale d'oncogènes [6] et des dommages à l'ADN en général [7-9]. Dès lors, la sénescence cellulaire fut principalement décrite comme une barrière essentielle à l'initiation tumorale [10]. En 2008, la découverte du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (PSAS) [11] principalement décrit comme pro-inflammatoire et tumorigène, marque le début de l'association de la sénescence cellulaire à la progression tumorale [12,13] et aux maladies liées au vieillissement [14,15]. Un peu plus tard, l'importance de la sénescence dans les processus physiologiques de cicatrisation [16-18] et d'embryogénèse [19-22] est également révélée. Enfin, la fin des années 2010 marque l'apparition des premières éliminations pharmacologiques des cellules sénescentes pour le traitement du cancer et des maladies liées au vieillissement [23-25].

1.2) Le phénotype sénescent

a) L'arrêt prolifératif associé à la sénescence (APAS)

La progression du cycle cellulaire est régulée par des points de contrôles qui, à chaque transition entre les différentes phases et après intégration des différents signaux de croissance et de stress, décident de la progression ou de l'interruption du processus. Cette machinerie protéique complexe inclut des kinases cyclines-dépendantes appelées CDK et leurs inhibiteurs, les CDKi [26]. Les CDK, par la stimulation de l'activité d'acteurs clés de la machinerie du cycle cellulaire, sont

responsables de la progression de ce dernier. De manière opposée, les CDKi sont responsables des arrêts transitoires ou définitifs du cycle et sont donc des biomarqueurs majeurs de la sénescence cellulaire [27-29]. Les principales CDKi incluent :

- Les protéines de la famille INK4 : p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} qui inhibent principalement les CDKs intervenant aux phase G0/G1 et G1/S du cycle (Figure 1) [26]
- Les protéines de la famille Cip/Kip incluant p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}, inhibant les CDKs des passages G1/S, G2/M, Intra-S ou Intra-M du cycle (Figure 1) [26]

Bien que p19^{ARF} (p14^{ARF} chez l'humain) soit issue du même locus que p16^{INK4a} et p15^{INK4b} (locus INK4b-ARF-INK4a), il ne s'agit pas d'une CDKi. Cependant, son rôle consiste également à arrêter le cycle cellulaire en bloquant l'activité Mdm2-dépendante d'ubiquitination, d'exportation nucléaire et de dégradation de p53, principal facteur de transcription de p21^{Cip1} [30].

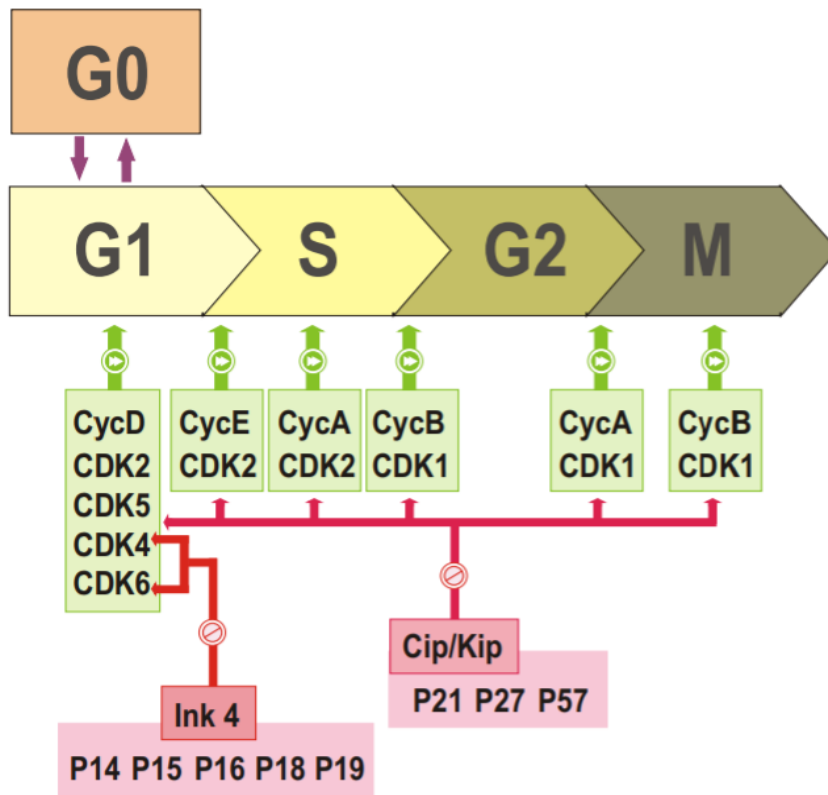


Figure 1. – Déclencheurs et inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire.

La progression à travers le cycle cellulaire est stimulée par des complexes cycline-CDK spécifiques (cases vertes) et inhibée par des CDKi de la famille INK4 et Cip/Kip (cases rouge). Par Locatelli P et al., Curr Drug Targets., 2019 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.

L'inhibition des CDK 2,4 et 6 par p16, p21, p27 ou p57 induit l'hypo-phosphorylation et l'activation du suppresseur de tumeur pRb, qui va ensuite lier et réprimer E2F, facteur de transcription majeur des gènes de la phase S [26]. Il en résulte un blocage en phase G1 du cycle cellulaire. De manière

générale, dans les cellules sénescents humaines, la voie p53/p21 est responsable de l'initiation l'APAS et p16, de son maintien. Une fois que pRb est pleinement engagée par p16, l'APAS devient irréversible et impossible à révoquer, même par l'inactivation ultérieure de Rb ou de p53 [31-33].

Il est possible de caractériser l'APAS en utilisant divers techniques et outils. L'IncuCyte™ Live-Cell Imaging System est un dispositif permettant l'acquisition et l'analyse automatisée d'images directement dans des cellules cultivées en incubateur, et ceci dans différents canaux de fluorescence et avec différents grossissements. Lorsque les cellules étudiées expriment l'histone H2B-GFP, marquant la chromatine par fluorescence, cet appareil permet l'acquisition rapide et reproductible du nombre de cellules présentes dans un puit à un instant t, même lorsque celle-ci sont à confluence [34,35]. Il s'agit donc d'un outil puissant pour mesurer l'influence d'un traitement sur la croissance d'une population cellulaire. En revanche, il est nécessaire de réaliser d'autres types d'expériences pour savoir si la variation du nombre de cellules observée est dû à une différence de viabilité de ces cellules ou à une différence dans leur potentiel prolifératif.

L'arrêt prolifératif, caractéristique clé de la sénescence, peut être quantifié au niveau fonctionnel par la technique de marquage à l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). Cette technique consiste au marquage fluorescent des cellules en prolifération par l'utilisation d'un analogue de la thymidine fluorescent capable de s'incorporer à l'ADN en cours de synthèse. Le marquage, dans un même temps, du nombre total de noyaux, grâce à un autre agent fluorescent appelé DAPI, permet ensuite de rapporter le nombre de cellules en prolifération au nombre total de cellules [36]. La phase du cycle à laquelle une population cellulaire est arrêté est également déterminable par cytométrie en flux, en extrapolant le contenu en ADN de cette population grâce à l'iodure de propidium, un agent intercalant fluorescent. Ainsi, alors qu'une population arrêté en phase G2/M possèdera deux fois plus d'ADN qu'une population arrêtée en phase G0/G1/S, une population en phase S disposera d'un contenu en ADN intermédiaire [37]. Au niveau moléculaire, la mesure de la quantité de transcrits provenant des gènes de chaque CDKi peut-être mesurée par la technique de PCR quantitative en temps réel [38]. Afin de différencier la sénescence cellulaire de la quiescence ou de la différenciation terminale, d'autres marqueurs que l'arrêt prolifératif doivent être évalués.

b) L'augmentation de l'activité SA β -galactosidase

Initialement décrite en 1995, l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal) correspond à une activité de la β -galactosidase lysosomale à pH 6, observée spécifiquement dans les cellules sénescents *in vitro* et *in vivo* [39,40]. Celle-ci est détectable après ajout de X-Gal dans le milieu menant à la formation d'un précipité bleu après clivage par l'enzyme.

c) Changements morphologiques

La morphologie élargie, aplatie et irrégulière est une des caractéristiques les plus anciennes des cellules sénescents, puisqu'elle a été découverte par Hayflick et Moorhead eux-mêmes lors de la première caractérisation de la sénescence en 1961 [2]. La voie mTOR, connue pour intégrer de nombreux signaux de stress et pour réguler la croissance cellulaire en conséquence, ainsi que la protéine ATF6 α , impliquée dans la réorganisation du cytosquelette de vimentine, sont deux contributeurs connus de ce phénotype [1,41].

d) Persistance de la réponse aux dommages à l'ADN

La réponse aux dommages à l'ADN (RDA) est une réponse physiologique déclenchée par les cellules pour lutter contre toutes formes de dommages à l'ADN endogènes ou exogènes [42]. La RDA consiste au recrutement d'un ensemble de facteurs au niveau de cassures de l'ADN pour former des structures protéiques appelées foyers de dommage à l'ADN. Cette voie est initiée par des structures protéiques servant de capteurs de dommages de l'ADN. Le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) détecte les cassures double-brin (CDB) de l'ADN et provoque ensuite le recrutement de la kinase apicale ATM. Les polymères de RPA détectent et recouvrent l'ADN simple brin exposé pour y recruter différents acteurs dont le complexe hétérotrimérique RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) entourant le brin d'ADN. RPA et le complexe 9-1-1, en addition à d'autres acteurs protéiques, sont responsables du recrutement et de l'activation d'ATR liée à la protéine ATRIP (Figure 2). Ainsi, alors qu'ATM est principalement activée par les CDB, ATR répond au stress génotoxique lors de la réplication de l'ADN [42]. Ces kinases sont responsables de la phosphorylation de la variante d'histone H2AX sur la sérine 139 (connue sous le nom de γ H2AX) dans la région proximale de la lésion de l'ADN. Le rôle de γ H2AX est de recruter MDC1, qui va ensuite recruter un complexe MRN au voisinage du premier et donc amplifier le signal de la RDA

(Figure 2). BRCA1 et -2, acteurs majeurs d'un processus de réparation fidèle appelé recombinaison homologue (RH), sont recrutés aux sites de dommages à l'ADN lors de leur phosphorylation par ATM et ATR [42]. La protéine 53BP1 est également impliquée dans le maintien de la signalisation RDA en renforçant l'activité d'ATM et est également importante pour les décisions relatives aux mécanismes par lesquels l'ADN sera réparé [43,44] (Figure 2). Finalement, la signalisation de la RDA se propage à partir de l'ADN endommagé par l'engagement des kinases diffusibles CHK2 (principalement phosphorylées par ATM) et CHK1 (principalement phosphorylée par ATR) qui font converger la signalisation vers des effecteurs en aval tels que p53 ou les CDC25, responsables des différentes décisions relatives aux destins cellulaires à la suite d'un stress, à savoir l'arrêt transitoire du cycle, processus indispensable à la réparation des dommages à l'ADN, l'arrêt prolongé du cycle (sénescence) et l'apoptose (Figure 2) [42,45-47]. La détection de l'activation de la RDA et des CDB est couramment faite par immunofluorescence par marquage des foyers de colocalisation des protéines γ H2AX et 53BP1 [1].

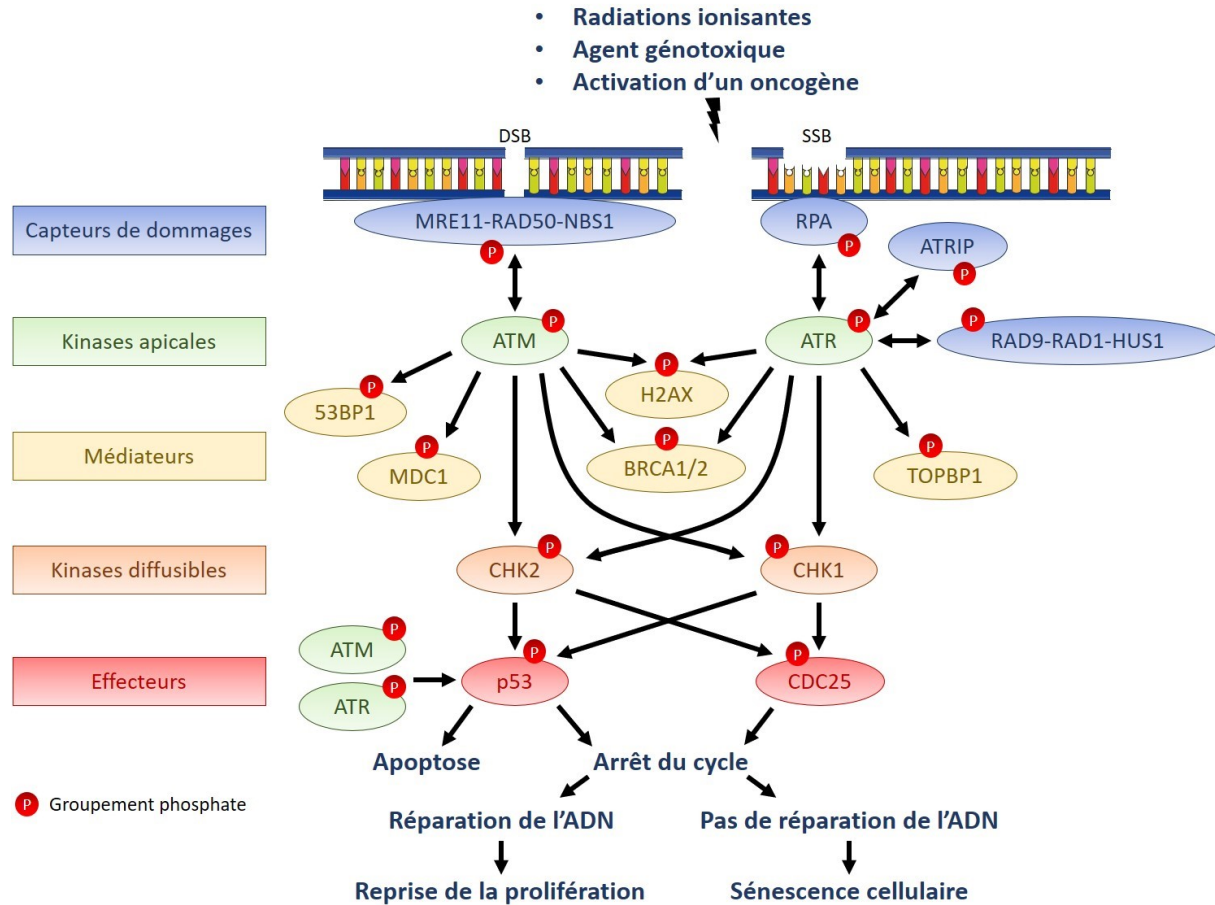


Figure 2. – La réponse aux dommages à l'ADN.

Le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) ainsi que la protéine RPA associée au complexe RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) recrutent les kinases apicales ATM et ATR, elle-même liée à la protéine ATRIP. Ces kinases phosphorylent l'histone H2AX sur la sérine 139 (connue sous le nom de γ H2AX), entraînant le recrutement de MDC1 puis d'un autre complexe MRN pour amplifier le signal de la RDA. Les protéines BRCA1/2 et 53BP1 sont également recrutées au site endommagé. Les kinases diffusibles CHK2 CHK1 nouvellement phosphorylées par les kinases apicales font converger la signalisation vers des effecteurs en aval tels que p53 ou les CDC25, responsables des différentes décisions relatives aux destins cellulaires.

Lorsque les lésions de l'ADN sont réparables, les foyers de dommages à l'ADN se résorbent généralement en 24 heures, période pendant laquelle les cellules suspendent temporairement leur progression dans le cycle cellulaire afin d'éviter toute crise liée à la réplication et/ou à la

mitose en présence de dommages à l'ADN [48,49]. Cependant, une signalisation continue de la RDA est observée au cours de la sénescence répliquative ou lors de traitements prolongés ou plus hautement dosés avec des agents induisant des dommages à l'ADN. Cette signalisation continue de la RDA est médiée par des foyers de dommages à l'ADN persistants appelés DNA-SCARS, sortes de « réservoirs » de signalisation de la RDA, responsables de l'arrêt prolifératif durable [5,31,50] et du phénotype sécrétoire [11,51] associé à la sénescence [49]. Les DNA-SCARS s'associent aux corps nucléaires de la protéine PML, sont dépourvus des protéines de réparation de l'ADN RPA et RAD51 et accumulent les formes activées de CHK2 et de p53, deux protéines clés de la RDA [49]. Ainsi, alors que la détection des protéines γ H2AX et 53BP1 est suffisante pour quantifier les foyers de dommages transitoires, la quantification des DNA-SCARS nécessite la détection additionnelle de la protéine PML [49]. Cependant, il est possible de détecter les foyers persistants de dommages à l'ADN avec un simple marquage γ H2AX et 53BP1 si ceux-ci ont été induits d'un seul coup (ex : irradiation) et si au moins 24h se sont écoulés entre leur induction et leur détection [49].

e) Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (PSAS)

Les cellules sénescents sécrètent une variété de facteurs solubles comme la chimiokine IL-8, les cytokines inflammatoires IL-6, IL-1 α et IL-1 β , les facteurs de croissance GM-CSF et IGFBP-2 ou encore des protéases de la famille des MMP [11,51,52]. En 2008, la découverte de ce phénotype sécrétoire baptisé PSAS [11], a permis par la suite de relier la sénescence au cancer et au vieillissement mais également à des processus physiologiques tels que l'embryogénèse ou la cicatrisation [52,53].

f) La résistance à l'apoptose associée à la sénescence (RAAS)

La résistance à l'apoptose face à divers stress est une caractéristique importante des cellules sénescents qui a permis la récente mise en place de stratégies pharmacologiques visant leur élimination [25,47,54]. Les membres de la famille des antiapoptotiques Bcl-2, en particulier Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W et Mcl-1 (voir [chap. 1.4.1](#)) sont particulièrement impliqués dans la survie des cellules sénescents et peuvent être régulés à la hausse via des mécanismes de régulation transcriptionnelle ou traductionnelle [54-57]. D'autre part, la surexpression de la protéine FOXO4

par les cellules sénescences permet également d'entraver l'activité proapoptotique cytoplasmique de p53 en maintenant sa séquestration dans le noyau [25].

1.3) Les mécanismes déclenchant la sénescence

a) Généralités

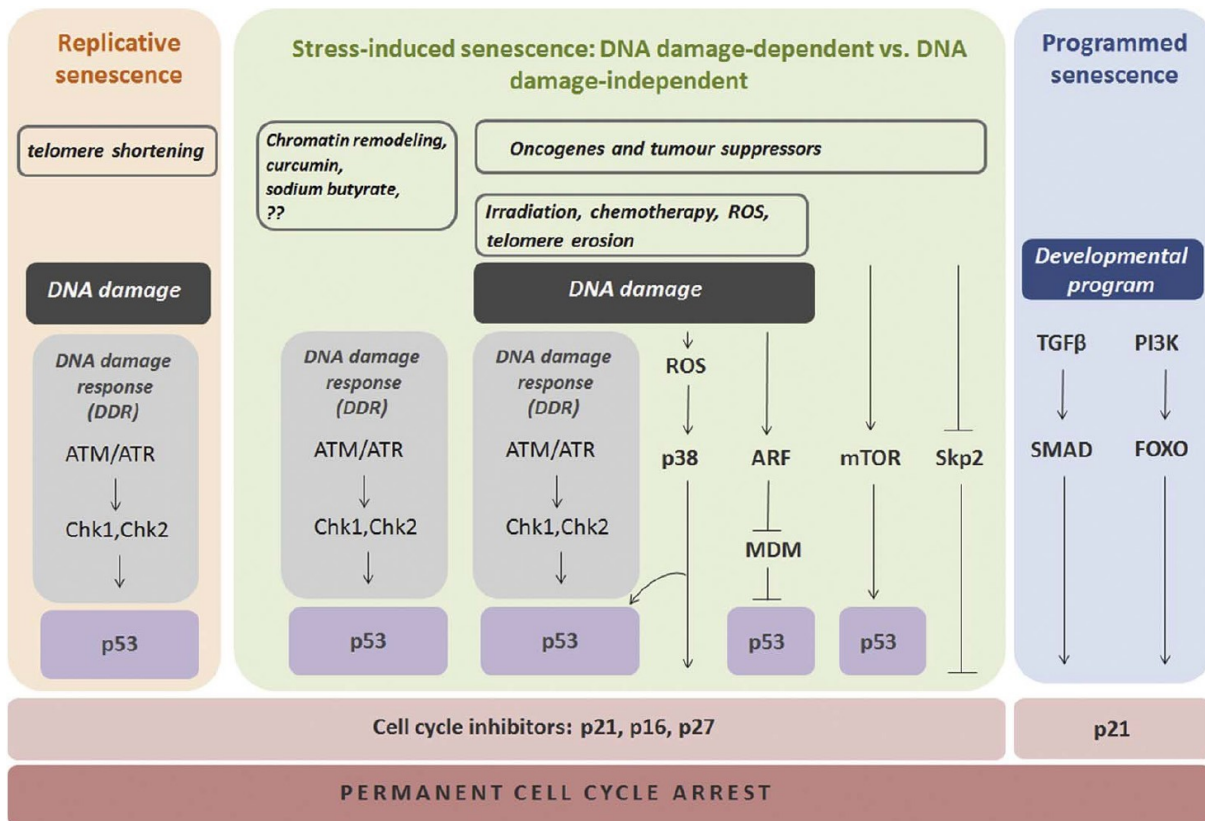


Figure 3. – Déclencheurs de la sénescence et voies effectrices.

Il existe trois types de sénescence cellulaire : la sénescence répliquante dépendante du raccourcissement des télomères, la sénescence programmée se produisant pendant le développement et la sénescence prématurée induite par les stress. Toutes ces voies convergent vers l'expression des CDKi menant à un arrêt permanent du cycle cellulaire. Par Bielak-Zmijewska A *et al.*, Mech Ageing Dev., 2018 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue

Dans les cellules normales, il existe 3 grands types de sénescences : la sénescence répliquante, la sénescence induite par le stress (SPIS) et la sénescence programmée (Figure 3). La sénescence répliquante ainsi que plupart des sénescences induites par le stress reposent sur l'activation de la

signalisation de la RDA par des dommages à l'ADN ou par d'autres mécanismes [58,59]. Pour plus de détails sur l'initiation de la RDA, consulter le [chap. 1.1.2.d](#). Lors d'un stress, la signalisation de la RDA, en addition à celle d'autres voies indépendantes telles que la voie mTOR ou la voie p14^{ARF} (p19^{ARF} chez les souris), va mener à la phosphorylation et à l'activation de p53, pouvant conduire soit à l'apoptose de la cellule soit à l'arrêt transitoire du cycle grâce à sa cible transcriptionnelle p21. L'expression de p16, CDKi et biomarqueur majeur de la sénescence, est plus complexe et peut être stimulée par divers acteurs connectés à la RDA ou indépendants de cette dernière, comme la MAP kinase p38 ou certains complexes de régulation épigénétique [60,61] (Figure 3).

b) La sénescence réplivative

La sénescence réplivative est le mécanisme sous-jacent de la limite de Hayflick, selon laquelle les cellules en culture ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois. Elle est causée par le raccourcissement des télomères lors de chaque réplication cellulaire [2,62]. Les télomères sont des éléments d'ADN répétitifs situés à l'extrémité des chromosomes linéaires et associés à des complexes protéiques appelés shelterin. La fonction des télomères est de prévenir l'exposition des extrémités chromosomique à la machinerie cellulaire de réparation, de dégradation et de recombinaison de l'ADN. En raison de l'incapacité intrinsèque des cellules à répliquer les extrémités des molécules linéaires, les télomères deviennent progressivement plus courts à chaque cycle de division cellulaire [3]. Lorsque ceux-ci atteignent une taille critique, le complexe shelterin se détache des répétitions d'ADN, ce qui provoque l'exposition d'ADN « nu » au milieu extérieur. Cet ADN est reconnu par les capteurs de la RDA ce qui déclenche l'apoptose p53-dépendante de la cellule concernée ou sa sénescence dépendante de p53, de p21 et de p16 [4,5,31] (Figure 3). L'expression ectopique de la télomérase, complexe enzymatique capable de rallonger les télomères, est suffisante pour immortaliser les fibroblastes humains, ce qui démontre que le raccourcissement des télomères est un facteur critique causal de la sénescence réplivative [63].

c) La sénescence prématurée induite par un stress (SPIS)

Alors que la sénescence réplivative se déclenche après des semaines, voire des mois de culture, la sénescence prématurée induite par le stress (SPIS) est un processus rapide observé en quelques

jours. Le premier lien entre la SPIS et les dommages à l'ADN a été fait en 1994, lors du traitement de divers cellules humaines saines ou tumorale par irradiation [7]. Cette induction de la SPIS est généralisable à la grande majorité des agents induisant des dommages à l'ADN, dont les chimiothérapies [59] (Figure 3). Les espèces réactives de l'oxygène, qu'elles soient produites de manière endogène par les mitochondries ou apportées artificiellement, sont également d'importants inducteurs de dommages à l'ADN, capable d'induire la SPIS via la RDA et/ou la MAP kinase p38 [58,64-66].

La SPIS peut être déclenchée lors de l'activation d'un oncogène, auquel cas elle est appelée sénescence induite par les oncogènes (SIO). La première caractérisation expérimentale de la SIO a eu lieu en 1997, lors d'une expérience de surexpression de l'oncogène HRAS^{G12V} dans des fibroblastes humains [6]. Bien qu'HRAS^{G12V} soit impliqué dans de nombreux cancers, sa surexpression a mené à un arrêt prolifératif définitif des cellules étudiées. Plus tard, il a été découvert ce phénomène était dû à une hyper-prolifération en phase S causant des dommages à l'ADN et activant la RDA [9,67]. La surexpression de HRAS^{G12V} s'accompagne d'une régulation positive de p19^{ARF}, p53, pRb et p16^{INK4a}, dont l'inactivation provoque l'évasion de la sénescence cellulaire induite [27] (Figure 3). La SIO peut également être induite par l'activation d'autres oncogènes tels que BRAF, AKT, E2F1 ou la cycline E [68,69]. Certains stress peuvent également induire la sénescence indépendamment des dommages à l'ADN et de la RDA. Par exemple, la sénescence induite par la perte du suppresseur de tumeur PTEN est caractérisée par une activation de p53 indépendante de la RDA mais dépendante de la voie mTOR et de la voie ARF, ainsi que par une induction de p16 via Ets2 [27]. La sénescence induite par la perte de VHL, un autre suppresseur de tumeur, est indépendante de p53 mais dépendante de p27, dont la régulation positive résulte de la régulation négative de Skp2, la E3-ligase dégradant p27 [70] (Figure 3). Le sodium butyrate, inhibiteur des histones désacétylases produit naturellement dans les intestins, est capable d'induire une sénescence associée à un PSAS et à une signalisation de la RDA sans dommages à l'ADN [59,71,72] (Figure 3).

d) La sénescence développementale programmée

La sénescence impliquée dans l'embryogénèse est appelée sénescence développementale programmée, car il s'agit d'un processus limité à des régions et à des structures particulières

suivant un cours temporel spécifique. Chez la souris et le poussin, cette sénescence est caractérisée par une augmentation de l'activité SA β -gal, la sécrétion d'un PSAS mais également par une indépendance aux dommages à l'ADN, à p53 et à p16. De manière intéressante, cette sénescence est paradoxalement dépendante de p21, alors induite par les voies TGF- β / SMAD et PI3K/FOXO [19,20,73] (Figure 3). De plus, une proportion de ces cellules sont capable de ré-entrer dans le cycle cellulaire lors des phases tardive du développement et sont retrouvée au sein de tissus viables après la naissance, suggérant que la sénescence programmée lors du développement est réversible [21].

Contrairement à la sénescence développementale programmée dans l'embryon, la sénescence placentaire, impliquée dans la formation du syncytiotrophoblaste, est induite par une activation coordonnée des voies de régulation p53/p21 et p16/pRb. Cependant, la dépendance de cette sénescence à la RDA et/ou aux dommages à l'ADN n'a pas encore été clairement établie [22,74,75].

1.4) Importance physiologique et physiopathologique de la sénescence cellulaire

- a) La sénescence : une barrière à la transformation néoplasique également impliquée dans de multiples processus physiologiques et physiopathologiques

Etant caractérisée par un arrêt prolifératif durable pouvant être déclenché par le stress génotoxique, le raccourcissement des télomères, la perte de suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes, la sénescence est principalement considérée comme une barrière essentielle à la transformation. L'immortalisation par la régulation à la hausse ou la réactivation de la télomérase est, par exemple, une caractéristique présente dans plus de 90 % des cancers [62]. Également, chez l'homme, les naevus sont des lésions cutanées bénignes souvent porteuses de mutations oncogéniques qui évoluent rarement vers le mélanome en raison de la sénescence induite par B-Raf [12]. Le contournement de la sénescence cellulaire est donc une étape importante et de l'initiation tumorale et de la transformation cellulaire, qui se caractérise par l'acquisition de diverses mutations altérant les acteurs clés de l'initiation et du maintien de la sénescence, comme p53, p16 ou Rb [76,77].

En addition à ce rôle antitumoral essentiel, la sénescence est également importante pour le développement embryonnaire et placentaire ainsi que pour la cicatrisation (voir [chap. 1.1.3.d](#)). En revanche, une accumulation/persistance des cellules sénescents dans les tissus des organismes âgés peut contribuer au développement de maladies liées au vieillissement dont le cancer [12] (Figure 4).

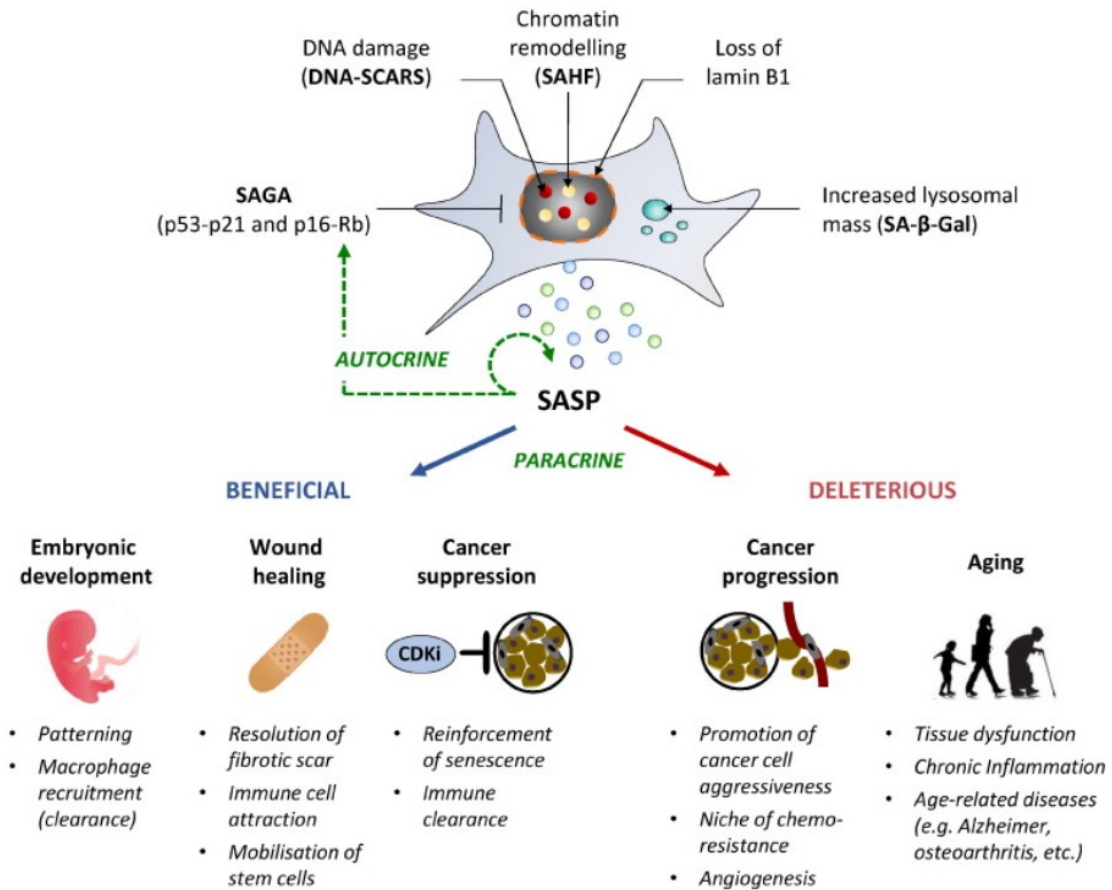


Figure 4. – La sénescence cellulaire est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques.

Les cellules sénescents présentent de multiples marques biochimiques dont la production accrue d'un sécrétome pro-inflammatoire (PSAS). Le PSAS génère de multiples signaux extracellulaires pouvant avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur l'homéostasie tissulaire et les processus biologiques. Par Malaquin N *et al.*, Exp Gerontol., 2016 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.

b) Implication dans la cicatrisation

La sénescence fait partie intégrante du processus de réparation tissulaire, où elle assure le contrôle de la plasticité et du caractère souche des cellules [78], de la déposition fibrotique [17,18] et de la fermeture des plaies [78]. Par exemple, lors d'une lésion, les cellules stellaires hépatiques ou les myofibroblastes cutanés prolifèrent et produisent la matrice extracellulaire nécessaire à la formation de la cicatrice fibrotique. Chez les souris normales, ces cellules finissent par devenir sénescents, ce qui les mène à dégrader la matrice extracellulaire via leur PSAS jusqu'à leur élimination par les cellules immunitaires. Chez les souris dépourvues des principaux régulateurs de la sénescence, ces cellules continuent de proliférer et induisent une fibrose excessive [16,17]. Il a également été montré que les fibroblastes et les cellules endothéliales sénescents apparaissent très tôt en réponse à une blessure cutanée pour promouvoir sa fermeture en induisant la différenciation en myofibroblastes par la sécrétion de PDGF-AA. L'élimination de ces cellules provoque l'altération de la fermeture optimale de la blessure, sauf lors de l'application topique de PDGF-AA en sauvetage [18].

c) Implication dans les pathologies liées au vieillissement

Le vieillissement est un processus complexe entraînant une altération progressive de la fonction et du potentiel régénératif des tissus d'un organisme [73]. L'expression de p16, marqueur majeur de la sénescence, augmente chez l'humain en fonction de l'âge dans les reins, la peau, le pancréas, le tissu adipeux ou les cellules T périphériques [79-84] ainsi que dans divers tissus de rongeurs, où une corrélation avec l'activité SA β -gal est également observée [85]. Dans cette dernière étude, une baisse de l'expression de p16 fut également observée lors de la restriction calorique, un traitement déjà décrit comme augmentant l'espérance de vie [86]. Le premier lien causal entre la sénescence et le vieillissement s'est fait en 2011, à l'aide d'un modèle de souris progeroïdes - au vieillissement accéléré - dans lesquelles les cellules p16-positives pouvaient être visualisées et éliminées [14]. Dans cette étude, l'élimination des cellules p16-positives retarda l'apparition des maladies liées à l'âge dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et l'œil. La réalisation d'une expérience similaire 5 ans plus tard chez des souris naturellement âgées valida définitivement l'expérience en démontrant un ralentissement de la tumorigénèse et de la détérioration des fonctions rénales, cardiaques et adipeuses ainsi qu'une augmentation de 30% de l'espérance de

vie en santé [15]. L'utilisation de la même construction a permis à d'autres études de lier la sénescence à d'autres pathologies liées au vieillissement comme les maladie cognitives tau-dépendantes, la perte osseuse, les dysfonctions métaboliques, la fibrose pulmonaire idiopathique ou la stéatose hépatique [81,87-90].

L'inflammation chronique de faible niveau ou « inflammaging » est à l'origine de nombreuses pathologies liées à l'âge. De nombreux facteurs solubles de l'inflammaging sont également retrouvés dans le PSAS des cellules sénescents, et l'élimination de ces cellules réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 α et le TNF- α dans la graisse, les reins et les muscles squelettiques des souris âgées. Cependant, faute de preuves directes, l'impact du PSAS en lui-même dans les maladies liées à l'âge est encore mal déterminée [27,91].

d) Les sénolytiques

La prévalence des maladies chroniques liées au vieillissement augmente continuellement. Les récents liens établis entre le vieillissement et la sénescence cellulaire ont donc suscité un intérêt croissant des laboratoires du secteur biotechnologique et pharmaceutique pour l'identification de molécules capables d'éliminer sélectivement les cellules sénescents, appelées sénolytiques [73] (Laboratoires Calico financés par Google ou Unity Biotechnology cofondé par Judith Campisi et Jan Van Deursen). Une avancée majeure dans ce domaine est la découverte en 2016 de l'activité sénolytique *in vivo* de l'ABT263, inhibiteur des antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (voir [chap. 1.4.1](#)). L'administration orale d'ABT263 permet l'élimination des cellules souches hématopoïétiques et musculaires sénescents de souris sub-létalement irradiées ou naturellement âgées [24] ainsi que l'atténuation de l'ostéoarthrite post-traumatique dans des modèles murins spécifiques [92]. D'autres inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille des Bcl-2 ont été identifiés pour leur activité sénolytique : l'ABT737 inhibant Bcl-2, Bcl-W et de Bcl-xL et induisant l'élimination des cellules sénescents des tissus pulmonaires et cutanées murins ainsi que l'A1155463 et l'A1331852, inhibiteurs de Bcl-xL uniquement, prévenant les neutropénies liées à l'inhibition de Bcl-2 [47,73]. Outre les inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille des Bcl-2, de plus en plus de composés sont identifiés pour leur activité sénolytique. Des plateformes de criblage à grande échelle ont permis la découverte d'autres sénolytiques, comme un inhibiteur de la chaperonne HSP90 capable d'augmenter l'espérance de vie en santé de souris progeroïdes

[93] ou un inhibiteur d'ATM, capable d'améliorer la cicatrisation des souris naturellement âgées [94]. D'autres composés naturels aux cibles moléculaires plus ou moins connues comme la quercétine, le piperlongumine ou la fisétine ont également été caractérisés comme ayant une activité sénolytique [73]. Le peptide FOXO4-DRI, conçu pour perturber l'interaction FOXO4-p53 spécifique aux cellules sénescents et ainsi provoquer leur apoptose, permet de contrer la toxicité hépatique et générale induite par la doxorubicine ainsi que de restaurer la forme physique, la fonction rénale, la densité pileuse et la sécrétion de testostérone des souris naturellement âgées [25,95].

e) Influence du PSAS sur la progression tumorale : généralités

Dépendamment du contexte, les cellules sénescents peuvent positivement ou négativement impacter la progression tumorale via leur PSAS, et ceci de manière autocrine ou paracrine [96] (Figure 4). Par exemple, le PSAS peut participer au recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles ou les macrophages à proximité des cellules sénescents pour initier leur élimination. Certains facteurs comme l'IGFBP-7, l'IL-6 ou l'IL-8 peuvent également induire ou renforcer la sénescence de manière paracrine. En revanche, le PSAS peut également promouvoir la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse, la transition épithélio-mésenchymateuse ou la chimiorésistance (Figure 4) [12]. Bien que le PSAS soit relativement conservé chez les mammifères et que certains facteurs du PSAS soient observés de manière récurrente, sa composition spécifique dépend fortement du type cellulaire impliqué, du stimulus induisant la sénescence et de la diversité des voies moléculaires impliquées dans sa régulation.

Le rôle de la sénescence et du PSAS dans le cancer de la prostate est abordée en détail [chap. 1.5](#).

2) Le cancer de la prostate : du diagnostic au traitement

2.1) Généralités

La prostate, mesurant environ 3 centimètres de long, de large et de haut et pesant environ 30 à 50 grammes, est une glande dont la fonction est de produire environ un tiers du liquide séminal du corps humain. Elle est située dans le bassin, à la base du pénis, entre la vessie et le rectum [97].

Représentant 20% des diagnostics de cancer en 2019, le cancer de la prostate (CP) est le cancer le plus diagnostiqué chez les hommes au Canada. Bien que la mortalité de ce cancer soit faible et que la survie nette des patients après 5 ans ait été estimée à 93% entre 2012 et 2015, le CP représente 9% des décès par cancer en 2019, ce qui en fait le 3^{ème} cancer le plus meurtrier au Canada après les cancers colorectaux et du poumon (Statistiques canadiennes sur le cancer 2019). La majorité des patients du CP sont initialement diagnostiqués d'une maladie localisée (80%) ou loco-régionale (12%). Bien que les maladies métastatiques au moment du diagnostic soient rares, celles-ci représentent un tiers des décès liés au CP [98].

2.2) Du cancer localisé hormonosensible au cancer métastatique hormonorésistant

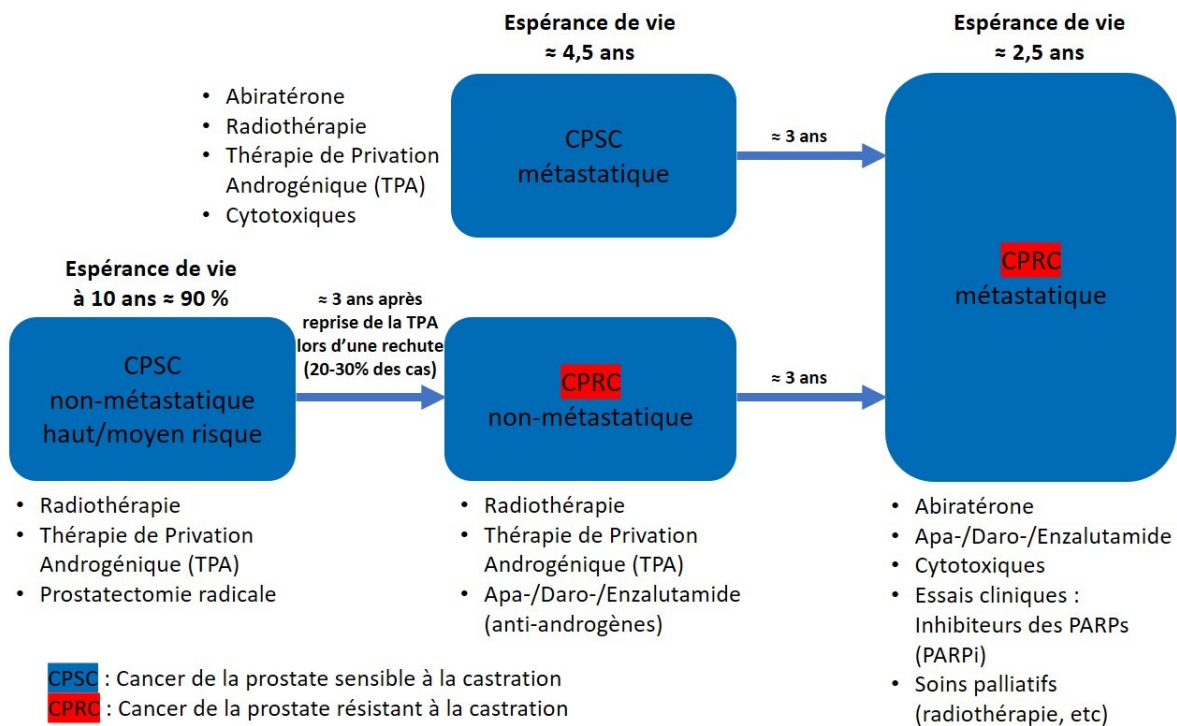


Figure 5. – Développement clinique du cancer de la prostate et traitements associés.

La croissance des tumeurs de la prostate est très souvent dépendante de la testostérone (T) et de la dihydrotestostérone, principales hormones androgènes chez l'homme. En conséquence, les traitements par privation androgénique (TPA), visant à supprimer les androgènes circulants, font partie des traitements de première ligne du CP localisé à haut risque et du CP métastatique

sensible à la castration [99-101] (Figure 5). Il s'agit également des traitements standards utilisés chez les 20 à 30% de patients pour lesquels les traitements primaires, visant l'élimination totale du cancer, n'ont pas mené à une stabilisation durable de la maladie [102,103]. Bien que le TPA présente un avantage en termes de survie, la suppression à long terme de la T provoque souvent l'émergence de populations cellulaires résistantes capables de croître sans production testiculaire de T. Ces cancers de la prostate résistants à la castration (CPRC), par opposition aux cancers de la prostate sensibles à la castration (CPSC), sont définis par leur progression biochimique et / ou clinique malgré des niveaux de testostérone dits « castrés » et émergent 2 à 3 ans après initiation de la TPA [104-106] (Figure 5). Ce phénomène peut être médié par la réactivation de la signalisation du RA par la production d'androgènes surrénalienne ou tumorale, l'amplification ou la surexpression du gène du RA, l'expression de variants d'épissage du RA constitutivement actifs, l'acquisition de mutations gains de fonctions impliquant le domaine de liaison ligand-RA ou la reprogrammation vers le lignage neuroendocrinien à croissance indépendante du RA [107,108]. Le CPRC métastatique (CPRCm) est le stade final de l'évolution du CPRC et survient généralement 3 ans après l'acquisition de la résistance à la castration [106,109]. Alors que l'espérance de vie d'un patient du CP localisé à haut risque est d'environ 90 % à 10 ans [110,111], celle d'un patient du CPRCm est d'environ 2,5 ans [104,112] (Figure 5).

2.3) Diagnostic et stratification des risques

a) Le toucher rectal et l'antigène prostatique spécifique

Le CP apparaît fréquemment dans la zone périphérique, partie de la prostate qui peut être palpée lors d'un diagnostic par toucher rectal [97]. La pratique du toucher rectal est recommandée dans de nombreux pays, parallèlement à l'évaluation des taux d'antigènes prostatiques spécifiques (APS), pour faciliter la prise de décision concernant l'orientation vers des tests de diagnostic. Ceux-ci consistent généralement en une biopsie transrectale ou transpérinéale, au cours de laquelle un certain nombre d'échantillons sont prélevés et envoyés pour examen histologique [113].

b) Le grade du cancer de la prostate

Le système de Gleason sert à déterminer le grade des cancers de la prostate selon des critères histologiques à partir de tissus prostatiques prélevés [114]. Dans un premier temps, le pathologiste détermine la cote de Gleason. Dans une biopsie, celle-ci résulte de la somme du grade le plus couramment observé et de celui le plus élevé. Ces grades varient de 1 à 5, avec 1 représentant un aspect glandulaire normal et 5, où il ne reste aucune architecture glandulaire et où il n'y a que des feuillettes de cellules cancéreuses anormales. L'addition des deux grades résulte en une cote de Gleason variant de 2 à 10. Lorsqu'elle est déterminée à partir d'une prostate entière, et non d'une biopsie, la cote de Gleason est la somme des 2 grades les plus couramment observés [114]. Depuis 2016, les cotes de Gleason calculées sont ensuite utilisées pour déterminer le groupe de grade (GG) du patient, indicateur final de l'agressivité du cancer variant de 1 à 5 [114] :

- GG 1 : Cote de Gleason inférieure ou égale à 6.
- GG 2 : Cote de Gleason de $3 + 4 = 7$
- GG 3 : Cote de Gleason de $4 + 3 = 7$, au moins bon pronostique que le GG 2.
- GG 4 : Toutes les combinaisons possibles menant à une cote de Gleason de 8.
- GG 5 : Cote de Gleason supérieure ou égale à 9.

f) Le stade du cancer de la prostate : classification TNM

La stadification du CP est un indicateur de l'étendu du CP se basant sur des techniques de tomodensitométrie, d'IRM, de scintigraphie osseuse ou de tomographie par émission de positons pour déceler toute propagation du cancer dans l'abdomen, le système squelettique, le bassin ou les ganglions lymphatiques. La réalisation de ces examens chez le patient permet ensuite d'établir la classification TNM du cancer (tumeur, nœud(s) lymphatique(s) et métastase(s)) [97]. De manière simplifiée :

- T varie de 1 à 4. Un numéro plus élevé signifie que la tumeur occupe une plus grande proportion de la prostate ou de la zone loco-régionale. Chaque passage à un numéro T supérieur est conditionné par le passage de sous-catégories désignées par des lettres (ex : T1a, T2b, etc.).

- N décrit l'étendue du cancer aux nœuds lymphatiques situés près de la prostate. N0 signifie que le cancer ne s'est étendu à aucun nœud et N1 signifie que c'est le cas.
- M décrit le caractère métastatique du cancer. M0 signifie que le cancer n'a pas fait de métastases et M1 signifie que le cancer en a fait.

g) Cancer localisé : stratification des risques et choix thérapeutique

Sur la base de résultats provenant d'autopsies, il a été montré que plus d'un tiers des hommes caucasiens et la moitié des hommes afro-américains âgés de 70 à 79 ans présentent un cancer de la prostate à bas risque non-diagnostiqué n'ayant pas posé de problème de leur vivant. Pour éviter des traitements lourds et inutiles, il est donc important de stratifier adéquatement les risques que représentent chaque CP [115]. Différents systèmes de stratifications des risques ont été adoptés par diverses associations comme l'American Urological Association (AUA), le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) et les Genitourinary Radiation Oncologists of Canada (GUROC). Toutes sont étroitement liées à la classification d'Amico parue en 1998 [116,117] (Tableau 1).

Institution/organization	Low risk	Intermediate risk	High risk
Harvard (D'Amico) ¹² AUA ³³ EAU ³⁴	T1-T2a and GS ≤6 and PSA ≤10	T2b and/or GS =7 and/or PSA >10-20 not low-risk	≥T2c or PSA >20 or GS 8-10
GUROC* ³ NICE ³¹	T1-T2a and GS ≤6 and PSA ≤10	T1-T2 and/or Gleason ≤7 and/or PSA ≤20 not low-risk	≥T3a or PSA >20 or GS 8-10
CAPSURE* ⁴¹	T1-T2a and GS ≤6 and PSA ≤10	T2b and/or GS =7 and/or PSA >10-20 not low-risk	T3-4 or PSA >20 or GS 8-10
NCCN ³⁰	T1-T2a and GS 2-6 and PSA ≤10 not very low-risk AND very-low risk category: T1c and GS ≤6 and PSA <10 and Fewer than 3 biopsy cores positive and ≤50% cancer in each core	T2b or T2c and/or GS =7 and/or PSA >10-20 not low-risk	T3a or PSA >20 or GS 8-10 not very high risk AND very high-risk category: T3b-4
ESMO ³²	T1-T2a and GS ≤6 and PSA <10	Not high risk and not low risk (the remainder)	T3-4 or PSA >20 or GS 8-10

AUA: American Urological Association; EAU: EAU = European Association of Urology; GUROC: Genitourinary Radiation Oncologists of Canada; NICE: National Institute for Health and Clinical Excellence; CAPSURE: Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavour; NCCN: National Comprehensive Cancer Network; ESMO: European Association of Urology; T: T stage; GS: Gleason score; PSA: prostate-specific antigen; *Use of the 1997 TNM staging system (T2a one lobe involvement, T2b two lobes involvement, no T2c category).

Tableau 1. – Systèmes de stratification des risques pré-traitement.

Par Rodrigues G et al., Can Urol Assoc J., 2012 – Autorisation d'utiliser cette figure obtenue.

Le calcul de l'espérance de vie ajustée aux comorbidités permet ensuite au médecin de proposer des traitements bénéfiques et adaptés au patient [118] (voir [chap. 1.3](#))

2.4) Les différents modèles *in vitro*

Des lignées tumorales extraites de tumeurs de patients atteints de CP sont utilisées par les laboratoires de recherche comme modèles *in vitro* de la maladie. Parmi ces lignées, les LNCaP métastatiques hormonosensibles ainsi que les PC-3 et les DU-145 métastatiques hormonorésistantes sont considérées comme la triade de référence pour la recherche contre le cancer de la prostate depuis leur caractérisation dans les années 80 [119]. Des cellules normales épithéliales comme les PrEC et d'autres lignées telles que les 22Rv1 métastatiques hormonorésistantes et les CWR22 issues d'un cancer localisé ont depuis été isolées et sont couramment utilisées [11,120,121].

a) Les LNCaP

Les cellules LNCaP, étant à l'origine de nombreuses autres lignées cellulaires dérivées comme les C4-2B ou les C4-2, ont été isolées à partir d'un adénocarcinome prostatique métastatique humain trouvé dans un ganglion lymphatique. La lignée originale répond aux androgènes et exprime l'APS et le RA, pour lequel la séquence codante contient une mutation T877A lui conférant une affinité de liaison à de nombreux composés stéroïdiens [120]. Cette lignée cellulaire est sauvage pour p53, a un temps de doublement en culture d'environ 60 à 72 heures et est fortement aneuploïde : son caryotype va de 33 à 91 chromosomes [120].

b) Les PC-3

Cette lignée isolée à partir d'une tumeur métastatique de la prostate est similaire aux DU-145 : elle est insensible aux androgènes et ne produit pas d'ARNm ni de protéines du RA ou d'APS [120]. La lignée des PC-3 présente un nombre modal de 58 chromosomes et une haute agressivité, avec un temps de doublement en culture d'environ 33 heures, ce qui est ≈ 2 fois moins que les LNCaP [120]. Les PC-3 sont considérées comme p53-déficientes car elles ne possèdent qu'un seul allèle du gène qui, de plus, produit une protéine aberrante du fait d'un décalage de phase entraînant un codon stop prématuré [122,123].

3) Le traitement du cancer de la prostate

L'ensemble des directives cliniques recommandent l'ablation de la prostate ou la radiothérapie combinées ou non aux TPA comme principales options de traitement primaire des CP localisés candidats à un traitement local agressif [100]. Les TPA sont également des traitements standards utilisés chez les 20 à 30% de patients présentant une maladie récurrente à la suite des traitements primaires [101-103]. Dans ce sous-chapitre, nous aborderons également les différentes chimiothérapies conventionnelles et émergentes utilisées pour le traitement des CP avancés. Les différents traitements chirurgicaux, dont l'explication est dispensable à la compréhension du mémoire, ne seront pas développés.

3.1) Les hormonothérapies

a) Les traitements par privation androgénique (TPA)

La forme originale de TPA qui reste d'usage dans le monde entier est l'orchectomie bilatérale, technique chirurgicale d'ablation testiculaire mais, bien que celle-ci soit efficace et peu coûteuse, elle reste traumatisante psychologiquement et irréversible [99].

Les agonistes et antagonistes de la LHRH, communément couplés à la radiothérapie pour le traitement primaire des adénocarcinome localisés, font également partie des premières thérapies développées pour réduire les niveaux de T à un niveau castré. Dans le corps humain, la production de testostérone est initiée par l'hypothalamus qui, par des libérations pulsatiles de LHRH, provoque la libération systémique de LH par l'hypophyse antérieure. Lorsque la LH atteint les testicules, celle-ci stimule la production de T. Alors que les agonistes de la LHRH assurent la suppression de la T via un mécanisme de rétrocontrôle négatif déclenchée par une poussée initiale de LH et de T, les antagonistes de la LHRH assurent la suppression de la T via une inhibition directe de la production de LH [99,124]. L'acétate d'abiratérone, indiqué dans le CPRCm où il est souvent administré en combinaison avec la prednisone et avec une ADT continue, est un inhibiteur d'une enzyme cruciale de la voie de biosynthèse des androgènes. Son utilisation permet de réduire la production d'androgènes provenant de toutes les sources, y compris des testicules, des glandes surrénales et des cellules du CP [125].

b) Les anti-androgènes (AA)

La voie de signalisation du RA peut être directement inhibée par des anti-androgènes (AA), antagonistes compétitif avec la liaison des androgènes au RA. Ceux-ci comprennent les AA de première génération comme le bicalutamide ou le flutamide et les AA de seconde génération enzalutamide, apalutamide et darolutamide, dont l'importance en clinique croit de plus en plus au fil des années [125,126].

En effet, l'enzalutamide a été approuvé en 2012 par la FDA pour les patients atteints de CPRCm déjà traités par chimiothérapie puis en 2014 pour les patients atteints de CPRCm naïfs à la chimiothérapie [127,128]. Enfin, à la suite de résultats cliniques montrant une amélioration de 2 ans de la survie médiane sans métastases des patients, l'enzalutamide est approuvé en 2018 pour le traitement des CPRC non-métastatiques [109,129].

3.2) La radiothérapie

Le rayonnement ionisant est un agent physique hautement chargé en énergie induisant la formation d'ions dans la matière qu'il traverse. Dans une cellule, l'absorption de cette énergie provoque, entre autres, des dommages à l'ADN menant au déclenchement de la RDA. Cette RDA, en addition à d'autres signalisation cellulaire, va entraîner l'arrêt du cycle transitoire, définitif (sénescence) ou l'apoptose de la cellule concernée, dépendamment de la quantité initiale de radiations, exprimée en Gy [130]. 1 Gy de radiations provoque environ 35 CDB dans l'ADN d'une cellule [42]. Les rayonnements ionisants, y compris les rayons X, les rayons γ et les particules β , sont aujourd'hui exploités dans de nombreux cancers [130]. Dans le CP localisé, les radiothérapies utilisées en traitements primaires sont la radiothérapie externe ainsi que la curiethérapie, qui est plus précise et souvent utilisée pour renforcer la dose reçue par la prostate après radiothérapie externe. Bien que ces deux techniques permettent une survie à long terme comparable lorsqu'elles sont employées seules [131], une étude datant de 2018 a montré que la combinaison de la radiothérapie externe à la curiethérapie permettait de diviser par 4 la mortalité spécifique du CP à 5 ans et par 3 l'incidence des métastases distantes à 5 ans, en comparaison à la radiothérapie externe seule [132]. Les radio-isotopes tels que le samarium-153 ou le strontium-89 sont également souvent utilisé comme traitement palliatif systémique, en particulier chez les

hommes présentant des métastases osseuses [133]. Récemment, le radium-223, une autre option de traitement dirigé vers l'os, a également montré une amélioration de la survie globale chez les patients atteints de CPRCm [134].

3.3) Les chimiothérapies cytotoxiques

Les 3 seules chimiothérapies cytotoxiques approuvées actuellement dans le traitement du CP sont le docétaxel, le cabazitaxel et le mitoxantrone [112,133]. Le docétaxel, utilisé comme chimiothérapie initiale dans le traitement du CPRCm et le cabazitaxel, utilisé comme chimiothérapie secondaire, sont deux agents ciblant les microtubules en altérant leur polymérisation [133]. Ceux-ci induisent une perturbation de la mitose des cellules en prolifération, conduisant au déclenchement du processus de catastrophe mitotique et à une apoptose ou à une sénescence subséquente [135,136] (voir [chap. 1.4.2](#)). Il a été montré qu'une formation de foyers γ -H2AX dépendante de la réplication était impliquée dans l'apoptose induite par le docétaxel dans des lignées de cancer du poumon [137], ce qui corrèle avec l'implication connue des CDB et de la RDA dans l'apoptose induite par la catastrophe mitotique [138,139]. L'inhibition des microtubules perturbe également le transport nucléaire des protéines de réparation de l'ADN, ce qui permet d'augmenter la toxicité des traitements aux inducteurs de dommages à l'ADN dont l'irradiation lors de traitements combinés [140]. En 2019, des résultats cliniques de phase I-II ont d'ailleurs montré une amélioration de la survie sans progression des patients atteints de CPRCm traités par cabazitaxel plus carboplatine, un inducteur de dommages à l'ADN [141], par rapport aux patients traités par cabazitaxel seul [142]. Le mitoxantrone, inhibiteur de l'ADN topoisomérase II, est également un inducteur de dommages à l'ADN indiqué dans le traitement des CPRC métastatiques, bien que son usage soit en déclin du fait qu'il n'apporte pas d'amélioration de la survie globale des patients [133,143].

3.4) L'immunothérapie

L'immunothérapie vise à augmenter la réponse du système immunitaire contre les cancers en progression. Le Sipuleucel-T est un vaccin autologue à cellules dendritiques approuvé par la FDA pour le traitement des CPRCm, qui agit en augmentant la réponse anti tumorale des cellules T. Bien qu'ayant produit une amélioration significative de la survie générale par rapport à un

placebo, l'adoption à grande échelle de ce traitement a été entravée par son processus de fabrication coûteux, sa fenêtre thérapeutique limitée et par les faibles bénéfices cliniques apportés. Bien qu'il existe encore des preuves précliniques et cliniques encourageantes en faveur de l'immunothérapie du CP dans certains contextes, son développement est pour l'instant limité par les résultats cliniques décevants des nouvelles approches de vaccination et d'inhibition des points de contrôles immunitaires [112,133,144].

3.5) Les inhibiteurs des PARPs : une chimiothérapie émergente

Les enzymes PARP1 et PARP2 sont des capteurs de dommages à l'ADN et des transductrices de signal se liant aux cassures simple brin (CSB) de l'ADN pour synthétiser des chaînes de polyADP-ribose (PAR) sur des protéines cibles (PARylation) autour de la cassure ainsi que sur elles-même (autoPARylation). Cette PARylation va enclencher le processus de réparation de l'ADN simple-brin en modifiant la structure de la chromatine et en y localisant les différents effecteurs. La létalité synthétique des inhibiteurs des PARPs (PARPi) dans les cellules cancéreuses déficientes en protéines BRCA 1/2 a été initialement interprétée comme un processus en deux étapes : (a) l'inhibition des PARPs provoque l'accumulation de CSB endogènes et (b) les CSB non-réparées sont convertis par les fourches de réplifications en CDB nécessitant les protéines BRCA 1/2 pour leur réparation par recombinaison homologue (RH) durant la phase S [145-147]. Il est désormais admis que l'effondrement des fourches de réplification et la formation de CDB menant à la mort des cellules BRCA 1/2 déficientes est majoritairement due à la formation de complexes ADN-PARPs, structures toxiques appelées « pièges » [148,149]^a [149]^b [150,151]. En effet, bien que l'olaparib ai une capacité d'inhibition catalytique presque 4 fois supérieure à celle du rucaparib, sa cytotoxicité dans les cellules BRCA déficientes est équivalente, ce qui corrèle avec les potentiels équivalents de « piégeage » de l'ADN des deux molécules. En plus d'être des inhibiteurs de la réparation de l'ADN, les PARPi sont donc également des agents induisant des dommages à l'ADN. D'ailleurs, bien que la déficience en recombinaison homologue joue un rôle majeur dans la sensibilité au PARPi, d'autres voies de réparation des dommages à l'ADN seraient impliquées dans ce processus [149]^a [149]^b [151,152].

Les altérations des gènes de réparation de l'ADN sont courantes dans le cancer métastatique de la prostate (CPm) : plusieurs études ont estimé que 8 à 12 % des CPm présentent des mutations BRCA2 et que 20 % à 25 % d'entre eux présentent des altérations dans les gènes liés à la RH et à la RDA [153,154]. Les données préliminaires des essais cliniques de phase II de monothérapie à l'Olaparib ont montré des taux de réponse prometteurs chez les patients atteints de CPRCm mutés sur des gènes de la RDA et de la RH dont BRCA1/2 et ayant progressé malgré au moins une ligne de chimiothérapie à base de taxanes, d'abiratéronne ou d'enzalutamide. En 2016, l'Olaparib a donc obtenu la désignation de « breakthrough therapy » (traitement prometteur) de la FDA pour le traitement de cancers de la prostate métastatique porteurs de mutations BRCA 1/2 ou d'ATM, ce qui promet d'accélérer substantiellement sa mise sur le marché. Le Rucaparib, un autre PARPi, a également reçu cette distinction pour des indication similaires fin 2018 [153,154].

4) Les destins cellulaires induits par la thérapie anticancéreuse

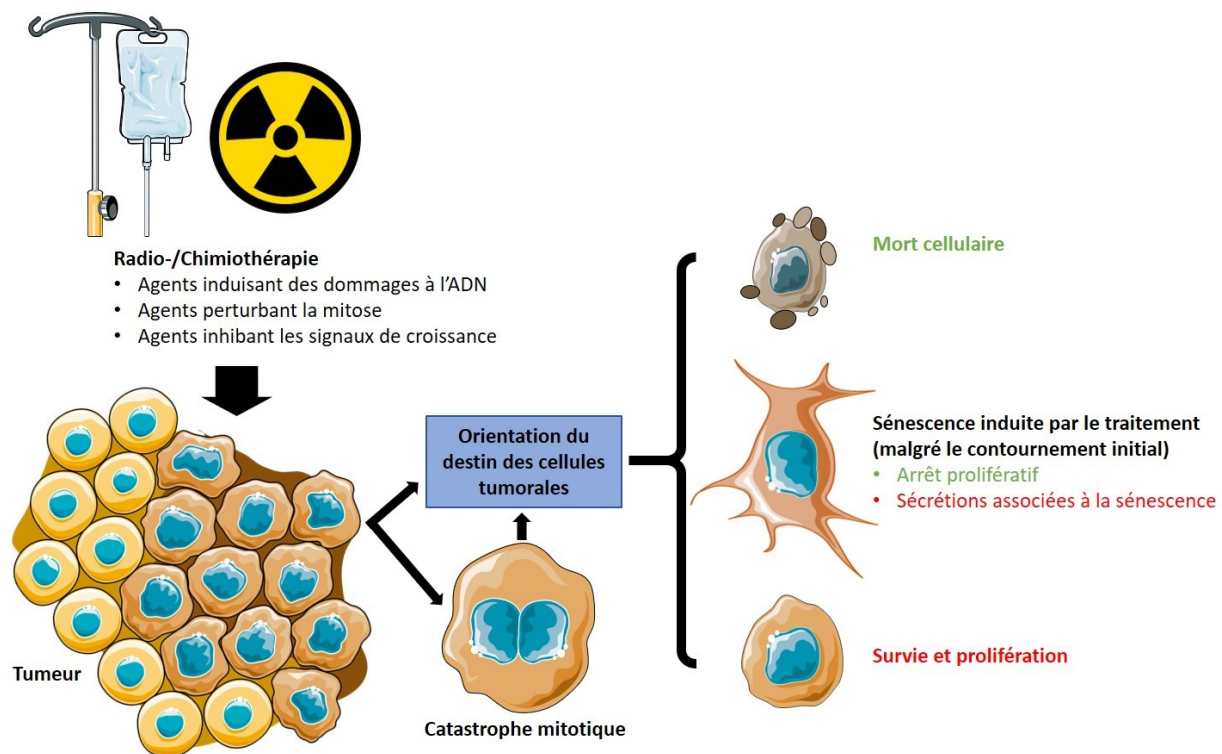


Figure 6. – Destins cellulaires induits par les thérapies anticancéreuses.

Vert : favorise la régression tumorale, rouge : favorise la progression tumorale.

À la suite du traitement anticancéreux, les cellules peuvent survivre, entrer en sénescence cellulaire ou mourir via différentes voies [12]. La catastrophe mitotique est une réponse cellulaire induite à la suite d'échecs ou de défauts mitotiques, dirigeant également les cellules concernées vers un de ces 3 destins cellulaires majeurs.

4.1) La mort cellulaire

Les cellules de mammifères exposées à des perturbations irrécupérables du microenvironnement intracellulaire ou extracellulaire peuvent activer l'une des nombreuses cascades de transduction de signaux qui conduisent finalement à leur disparition [155]. Ces modes régulés de mort cellulaire comprennent, par exemple, l'apoptose, la nécroptose, la pyroptose, la NETose ou la mort cellulaire dépendante de l'autophagie et sont initiés et propagés par des mécanismes moléculaires interconnectés [155]. Ils sont à distinguer de la mort cellulaire accidentelle, forme quasi instantanée et incontrôlable de mort cellulaire correspondant au désassemblage de la membrane plasmique causé par des stress physiques, chimiques ou mécaniques extrêmes [155].

a) L'apoptose

L'apoptose, processus actif et contrôlé de « suicide cellulaire », peut être induite via deux voies distinctes : la voie intrinsèque ou mitochondriale, activée par des stress tels que la privation en cytokines ou les dommages à l'ADN, et la voie extrinsèque, induite par l'activation des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR) portant un « domaine de mort » intracellulaire. Toutes deux convergent vers la voie des caspases [156].

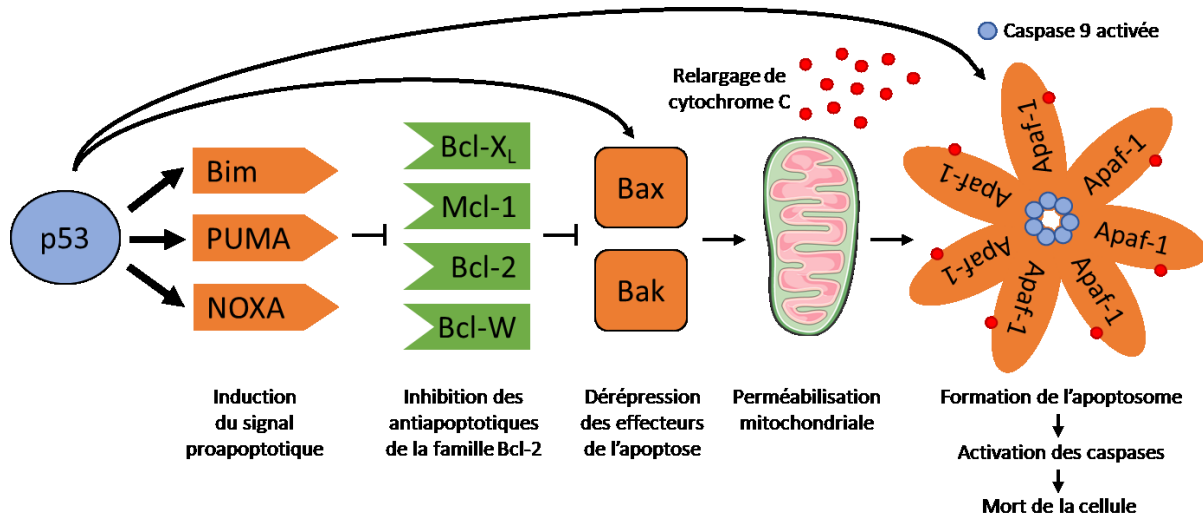


Figure 7. – Mécanismes de l’apoptose induite par p53 via la voie intrinsèque.

Les flèches les plus épaisses indiquent les cibles transcriptionnelles essentielles à l'apoptose induite par p53. Les fines flèches indiquent les cibles transcriptionnelles pour lesquelles l’augmentation de l’expression n’est pas indispensable à l’apoptose induite par p53.

Dans la voie intrinsèque, régulée par les protéines de la famille Bcl-2, la mort cellulaire est initiée par la régulation transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle des pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (BIM, PUMA, BID, BAD, NOXA...). Ces protéines se lient et inhibent les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ou Bcl-W, libérant ainsi les effecteurs de mort cellulaire BAX et BAK. L'activation de BAX et/ou BAK provoque la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale : le point de non-retour de la signalisation apoptotique induisant une activation des caspases menant à la formation de l’apoptosome et à la destruction de la cellule [156] (Figure 7). p53 est un médiateur majeur de l’apoptose des cellules saines et tumorales ayant lieu à la suite de dommages à l’ADN par irradiation ou chimiothérapie [156]. Lors de l’apoptose p53-dépendante, p53 activée augmente directement la transcription de PUMA et de NOXA, deux médiateurs essentiels au processus, ainsi que la transcription du pro-apoptotique BAX et de APAF-1, une protéine d’échafaudage requise pour la formation de l’apoptosome et l’activation des caspases (Figure 7) [156]. Il a également été montré que p53 était capable d’induire la perméabilisation mitochondriale et l’apoptose en inhibant les anti apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 directement dans le cytosol [25,157].

b) Distinction des différents modes de mort cellulaire

Chaque type de mort cellulaire peut se manifester par un spectre complet de caractéristiques morphologiques allant de nécrotique à apoptotique, et par un profil immunomodulateur allant d'anti-inflammatoire et tolérant à pro-inflammatoire et immunogène [155]. Le morphotype apoptotique se caractérise par un rétrécissement cytoplasmique, une condensation de la chromatine (pycnose), une fragmentation nucléaire (caryorrhexie) et une hémorragie de la membrane plasmique, culminant vers la formation de petites vésicules (corps apoptotiques) qui sont absorbées par les cellules voisines à activité phagocytaire et dégradées dans les lysosomes [155]. Le morphotype nécrotique se caractérise par des corps cellulaires présentant une dissolution nucléaire et des ruptures aléatoires de la membrane plasmique, qui sont éliminés en l'absence d'implication phagocytaire et lysosomale [139,155].

In vitro, une caractéristique commune aux stades finaux de toutes les morts cellulaires, dont l'apoptose lorsque les cellules cultivées ne présentent pas d'activité phagocytaire, est l'acquisition d'un morphotype nécrotique (nécrose secondaire) caractérisé par une perméabilisation de la membrane plasmique permettant l'entrée et la sortie des contenus cellulaires [155,158]. L'utilisation de sondes fluorescentes se liant à l'ADN telles que le Draq7 ou l'iodure de propidium permet donc, dans un échantillon, la détection et la quantification générale des cellules mortes et perméables ayant leur ADN exposé [158,159]. La caractérisation approfondie du mode de mort cellulaire encouru implique la mesure additionnelle de différentes caractéristiques biochimiques, moléculaires et morphologiques à l'aide de techniques spécifiques [158].

4.2) La catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique (CM), telle que définie en 2012 par le Comité international de la nomenclature sur la mort cellulaire, est un mécanisme antitumoral intrinsèque détectant la défaillance mitotique d'une cellule pour la diriger vers un destin antiprolifératif irréversible de mort ou de sénescence [160]. Elle est induite lors de l'entrée en mitose à la suite de dommages à l'ADN ou après traitement par des perturbateurs mitotiques, et se traduit par un arrêt en mitose suivi de différents destins : la mort en cours de mitose ainsi que la mort ou la sénescence durant

la phase G1 subséquente [160]. Certaines cellules sont également capables d'échapper à la mort ou à la sénescence pour retourner dans le cycle cellulaire sous la forme de cellules tétraploïdes ou aneuploïdes. Ces cycles de réplication supplémentaire peuvent conduire à la mort des cellules par mauvaise ségrégation chromosomique répétée ou à la génération stochastique de cellules aneuploïdes viables et tumorigènes [160-163]. La RDA ainsi que p53 jouent un rôle prépondérant dans la décision concernant les destins cellulaires encourus à la suite de la catastrophe mitotique [139,160,164].

4.3) La sénescence induite par la thérapie (SIT)

Théoriquement, dans les modèles de progression du cancer en plusieurs étapes, les cellules cancéreuses ont déjà contourné la sénescence cellulaire lors de leur transformation par l'acquisition de diverses mutations altérant la régulation de suppresseurs de tumeurs clés de la sénescence comme p53, p16 ou Rb [76,77]. Cependant, de manière surprenante, celles-ci conservent souvent la capacité d'y entrer à la suite du traitement anticancéreux. Cette sénescence induite par la thérapie (SIT) s'explique par le fait que la sénescence résulte de multiples voies de signalisation (voir [chap. 1.1.3](#)) parfois conservées dans les cellules cancéreuses pour empêcher la progression des cellules endommagées dans le cycle cellulaire [12]. La SIT est un processus grandement caractérisé et impliquant de nombreux agents anticancéreux tels que la doxorubicine, le paclitaxel, le temozolomide (TMZ), le cisplatine, la gemcitabine, le carboplatine, l'olaparib ou le Rituximab, capables d'induire la sénescence des lignées cancéreuses du sein, du pancréas, du poumon, de l'ovaire ou du lymphome à cellules B [47,165-169]. La SIT dans le contexte du cancer de la prostate est abordée [chap. 1.5.1](#).

a) SIT et arrêt prolifératif associé à la sénescence (APAS)

Il est logique d'imaginer que la réactivation de l'arrêt prolifératif associé à la SIT puisse mener à un arrêt durable de la croissance tumorale. Cependant, bien que la sénescence soit induite par de nombreux traitements anticancéreux, l'échappement des tumeurs à l'APAS est fréquemment noté. En fonction du contexte, cette reprise de la prolifération peut être médiée par sélection clonale ou, au contraire, par un mécanisme impliquant l'ensemble de la population tumorale concernée [47,170]. Ce phénomène de réversibilité de l'APAS lors de la SIT est cohérent avec la

plus faible redondance des voies d'établissement et de maintien de la sénescence au sein des cellules cancéreuses. Il est donc plus pertinent de considérer les phénotypes de la SIT comme des phénotypes à large spectre, « semblables » à la sénescence, que comme des phénotypes de sénescence classiques.

b) Les sénolytiques dans le ciblage de la SIT

Les approches « d'enchaînement » (one-two punch approach) sont des stratégies thérapeutiques anticancéreuses visant, dans un premier temps, à déclencher la SIT dans les tumeurs puis, dans un second temps, à rediriger les cellules tumorales sénescentes vers la mort cellulaire grâce à des sénolytiques. La première approche d'enchaînement a été décrite en 2009 dans des cellules humaines de cancer du pancréas devenant sénescentes à la suite du traitement à la gemcitabine. L'addition de céramide, un sphingolipide proapoptotique, au milieu de culture permettait alors d'obtenir un taux de mort cellulaire dépassant les 90%. Lorsque les cellules étaient traitées à la gemcitabine seule, les taux ne dépassaient pas les 70%, même à des doses très fortes [171]. Dans le cancer du poumon, l'induction de sénescence par le cisplatine ou le paclitaxel est associé à une baisse du taux d'acétylation de l'histone 3 et à une augmentation de l'expression de Bcl-xL. La combinaison de ce traitement au panobinostat, un inhibiteur des histones désacétylases, inverse le phénotype et induit synergiquement la mort des cellules tumorales pulmonaire [172]. Une récente étude de notre équipe a montré que le traitement aux PARPi induisait la sénescence des lignées cancéreuses du sein et de l'ovaire, mais que celles-ci étaient ensuite capables d'y échapper pour recommencer à proliférer. Dans le but d'exploiter cette fenêtre d'action transitoire, des inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille Bcl-2 ou du piperlongumine furent ajouté au traitement et permirent d'améliorer considérablement son efficacité *in vitro* ainsi que dans des modèles précliniques [47].

Deux approches différentes de criblage à grande échelle ont aussi pu identifier, dans des lignées issues de plusieurs types de cancers, des cibles moléculaires induisant une sénescence ciblable par l'ABT263 [173]. En 2019, cette même équipe a conçu une approche d'enchaînement entière à partir de criblages à grande échelle, par l'identification, dans un premier temps, d'une molécule capable d'induire la sénescence des lignées du cancer du foie et, dans un second temps, d'une

molécule dirigeant spécifiquement ces cellules vers la mort cellulaire, obtenant ainsi des résultats *in vitro* et précliniques prometteurs [174].

5) La sénescence cellulaire et le cancer de la prostate

Les suppresseurs de tumeurs Pten et p53 sont parmi les gènes les plus souvent inactivés ou mutés dans le cancer humain, y compris dans le cancer de la prostate. La première étude ayant démontré que la sénescence cellulaire était une barrière de dernier recours à l'initiation tumorale *in vivo* a été réalisée en 2007 dans un modèle de CP murin. Dans cette étude, alors que l'inactivation de p53 dans les prostates murines ne produisait pas de phénotype tumoral, celle de PTEN menait au déclenchement d'une réponse de sénescence suivie de l'émergence d'un CP invasif non-mortel après un temps de latence de 4 à 6 mois. De manière intéressante, dans la même étude, l'inactivation combinée de Pten et de p53 provoquait un CP invasif et mortel chez la souris 2 semaines après la puberté, démontrant ainsi l'importance critique de la sénescence dans la prévention de l'initiation tumorale [175].

5.1) La sénescence induite par les traitements du cancer de la prostate

Les traitements aux inhibiteurs des PARPs et à l'irradiation, deux inducteurs de dommages à l'ADN menant à l'activation de la RDA, induisent la sénescence des lignées du CP LNCaP et PC-3, y compris dans les xénogreffes murines. Celle-ci se caractérise par une activité SA β -gal augmentée, un arrêt prolifératif en G2/M dépendant de p16 et de p53 et/ou p21, une augmentation du nombre de foyer de dommages à l'ADN ainsi qu'un PSAS [11,176-179]. Il n'existe pour l'instant aucune preuve démontrant l'existence de la sénescence induite par les traitements par PARPi ou par radiothérapie dans les tumeurs humaines, bien qu'une étude ait déjà montré que la radiothérapie augmentait l'expression de p53 et de Bcl-2 dans les tissus prostatiques de patients [180].

La sénescence peut également être induite dans diverses lignées du CP dont les PC-3 et les LNCaP, mais également dans les tissus humains après traitement par privation androgénique (TPA). Cette sénescence se caractérise par une activité SA β -gal augmentée, un arrêt de croissance dépendant de p16 et de p27^{Kip1}, une surexpression de l'antiapoptotique Mcl-1 et une sécrétion d'IL-8, de

cathepsin B et d'IGFBP3. Etonnamment, cette sénescence semble indépendante de la voie p53/p21 malgré la présence de foyers γ H2AX et 53BP1 [28,57,181-183]. L'Enzalutamide, anti-androgène à l'importance croissante en clinique (voir [chap. 1.3.1.b](#)), a également été décrit comme induisant la sénescence des cellules du CP [184-186]. De manière similaire aux LNCaP traitées par privation androgénique, les LNCaP traitées à l'enzalutamide présentent un arrêt de croissance en G1 et une activité SA β -gal accrue. Cependant, elles ne présentent pas d'augmentation du nombre de foyers de dommages à l'ADN et leur profil d'expression des gènes liés aux CDKi et au PSAS reste à déterminer.

Des études ont paradoxalement démontré que l'administration d'androgènes à des taux supraphysiologiques pouvait également induire la sénescence des LNCaP, des PC-3 exprimant le RA et des tissus primaires humains traités *ex vivo*, ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale dans des modèles précliniques. Bien qu'induisant des dommages à l'ADN, ce traitement induit une sénescence qui semble dépendante des voies p16/Rb, p21 et Skp2/p27, mais pas de la RDA ni de p53 [186-190]. Une récente étude a d'ailleurs montré que ces cellules présentaient une sensibilité au sénolytique Ganetespib, inhibiteur de la chaperonne HSP90 [186]. L'injection intermittente ou continue de T à des doses supraphysiologiques a par ailleurs montré des taux de réponse prometteurs dans des essais cliniques menés chez des patients du CP [191].

D'autres traitements anticancéreux comme la doxorubicine, le mitoxantrone et le docetaxel sont connus pour induire la sénescence des cellules du CP dans des lignées ainsi que des tissus prostatiques humains et murins [11,192-194].

5.2) Influence de la sénescence dans la progression du cancer de la prostate

Dans le cas du CP, les sécrétions des cellules sénescents semblent être davantage impliquées dans la progression de la maladie. Par exemple, une signature sécrétoire composée d'IL-6, -8, de GM-CSF, d'IGFBP2 et d'IL-1 β est retrouvée dans des biopsies de patients atteints du CP ayant été traités par mitoxantrone [11]. Parmi ces cytokines, la cytokine pro-inflammatoire IL-6 ainsi que l'IGFBP-2 ont toutes deux été décrites comme jouant un rôle important dans le développement de l'insensibilité aux androgènes et dans la croissance des CP [195,196]. Par ailleurs, l'IL-8,

également retrouvée dans le PSAS des cellules de CP dont la sénescence a été induite par la TPA (voir [chap. ci-dessus](#)), promeut la prolifération de diverses lignées de la prostate dont les LNCaP et les PC-3 [197,198] et corrèle avec l'agressivité clinique de la maladie [199]. *In vitro*, les sécrétions des fibroblastes prostatiques humains sénescents favorisent l'agressivité du CP en facilitant l'angiogénèse, la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules PC-3 via l'IL-6 et -8 et le recrutement des monocytes ainsi que leur polarisation en macrophage protumoraux. Ces fibroblastes présentent une augmentation du nombre de transcrit pour les gènes de l'IL-6, -8, du VEGF-A, et des MMP2 et 3, signature également retrouvée dans des bases de données d'expression génique des tumeurs de la prostate [200]. La sécrétion de WNT16B par les fibroblastes microenvironnementaux favorise également la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans l'épithélium néoplasique de la prostate, ainsi que la survie cellulaire après thérapie cytotoxique [201]. Les lignées sénescents du CP traitées par irradiation peuvent également sécréter des exosomes dépendamment de p53. Ceux-ci sont enrichis en protéine B7-H3, un marqueur diagnostique récemment identifié pour le CP, et sont capables d'induire une reprogrammation oncogénique des cellules souches adipocytaires présentes dans les tumeurs du CP, menant ultimement à la progression de la tumeur entière *in vivo* [179,202].

De manière intéressante, le PSAS des cellules stromales mésenchymateuses irradiées est capable d'induire la sénescence des cellules de CP immortalisées non-malignes, limitant ainsi leur prolifération. En revanche, cette activité n'est pas retrouvée dans les cellules du CP métastatique dont les PC-3, ce qui suggère que, dans un contexte où le PSAS serait antitumoral, celui-ci lutterait contre les événements de pré-tumorigénèse plutôt que contre les cellules malignes déjà transformées [203]. Les composantes pro- et antitumorales du PSAS peuvent également être sélectivement manipulées pour améliorer l'efficacité des traitements du CP. En effet, dans les tissus prostatiques murins déficients en PTEN, le PSAS des cellules sénescents est contrôlé par NF- κ B, mais également par la voie Jak2/Stat3, qui facilite la progression tumorale par l'établissement d'un microenvironnement immunosupprimé. Chez les mêmes souris, l'inhibition de Jak2 permet l'établissement d'une forte réponse immunitaire antitumorale mais aussi l'amélioration de l'efficacité du traitement au docétaxel, chimiothérapie induisant également la sénescence dans ce contexte [193]. Le PSAS des cellules sénescents stromales et épithéliales est

également impliqué dans la progression des hyperplasies bénignes de la prostate, maladies entraînant une obstruction de l'écoulement urinaire et représentant une morbidité considérable chez une majorité d'hommes âgés [204-206].

Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs

1) Prémisses

La plupart des tumeurs de la prostate répondent bien aux traitements de première ligne que sont la prostatectomie et la radiothérapie, en combinaison ou non à la privation androgénique. Cependant, la progression de la maladie vers le stade métastatique hormonorésistant est observée dans environ 10% des cas. Bien que les récents essais cliniques des inhibiteurs PARPi aient montré une augmentation encourageante de la survie des patients, ces cancers métastatiques restent aujourd'hui incurables, du fait de l'apparition systématique de résistances au traitement. La compréhension des mécanismes menant à l'émergence de résistances est donc indispensable à la meilleure prise en charge de la maladie. Il est à présent connu qu'à la suite d'un stress, la mort et la survie ne sont pas les seuls destins possibles d'une cellule. La sénescence, arrêt de croissance permanent associé à un phénotype sécrétoire (PSAS) est également une voie possible. Bien qu'étant presque toujours mutées pour au moins un des gènes déclenchant la sénescence (ex : p53/p21 ou p16/Rb), les cellules cancéreuses conservent souvent la capacité d'y entrer en réponse au traitement. Cette sénescence induite par le traitement (SIT) peut interférer avec la progression tumorale grâce à l'arrêt de croissance provoqué et par la signalisation paracrine du PSAS. Cependant, des effets protumoraux du PSAS ont également été observés dans certains contextes de SIT.

2) Problématique

Il a récemment été montré par notre équipe que le traitement aux PARPi induisait la sénescence des lignées cancéreuses du sein et de l'ovaire, mais que celles-ci étaient ensuite capables d'y échapper pour recommencer à proliférer. Dans la même étude, les cellules rendues sénescents par l'exposition au PARPi avaient pu être ciblées grâce à des sénolytiques déclenchant spécifiquement l'apoptose des cellules sénescents, ce qui a considérablement amélioré l'efficacité *in vivo* et *in vitro* du traitement. Sachant que la SIT semble être induite dans le cancer de la prostate par les traitements à l'olaparib, à l'irradiation et à l'enzalutamide, notre hypothèse

est qu'elle pourrait également être ciblée par des sénolytiques, ce qui pourrait potentiellement ouvrir la voie vers de nouvelles combinaisons thérapeutiques pour le traitement clinique du cancer de la prostate.

3) Objectifs

De cette hypothèse ont émergé 2 objectifs :

- Le premier a été de caractériser précisément les destins cellulaires de la lignée tumorale LNCaP, sensible aux androgènes et caractéristique des adénocarcinomes, et de la lignée PC-3, indépendante aux androgènes et caractéristique des CP à petites cellules, en réponse à 2 traitements courants : l'irradiation et l'enzalutamide, et à un traitement émergent : l'olaparib, inhibiteur des PARPs. Ceci a été réalisé par l'évaluation *in vitro* des différents marqueurs liés à la mort cellulaire, à la sénescence et à la catastrophe mitotique.

Notre second objectif a été d'évaluer la sensibilité aux sénolytiques des lignées dont la sénescence a été induite par un ou plusieurs des traitements. Trois sénolytiques ayant déjà fait leur preuve dans le cancer de l'ovaire ont été sélectionnés pour l'étude : deux inhibiteurs des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ABT263 et A1155463 et un composé naturel, le piperlongumine (PPL), déjà plusieurs fois décrit comme ayant une sénolytique. Les traitements induisant la sénescence ont donc été appliqués aux lignées en combinaison à l'un ou l'autre des sénolytiques et la viabilité ainsi que de la mort cellulaire furent évalués subséquemment.

Chapitre 3 – Résultats expérimentaux : article - Cells, MDPI

Article

DNA Damage- but Not Enzalutamide-Induced Senescence in Prostate Cancer Promotes Senolytic Bcl-xL Inhibitor Sensitivity

Nicolas Malaquin ^{1,†}, Arthur Vancayseele ^{1,†}, Sophie Gilbert ², Laureen Antenor-Habazac ¹, Marc-Alexandre Olivier ¹, Zakia Ait Ali Brahem ¹, Fred Saad ^{2,3}, Guila Delouya ^{1,4} and Francis Rodier ^{1,4, *}

¹ Francis Rodier lab, Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada

² Fred Saad lab, Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada

³ Université de Montréal, Département de Médecine, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

⁴ Université de Montréal, Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire, Montreal, QC H3T 1A4, Canada

* Correspondence: 1 (514) 890 8000 (ext. 26939)

† These authors contributed equally

Received: 5 June 2020; Accepted: 26 June 2020; Published: 1 July 2020

Abstract: Cellular senescence is a natural tumor suppression mechanism defined by a stable proliferation arrest. In the context of cancer treatment, cancer cell therapy-induced senescence (TIS) is emerging as an omnipresent cell fate decision that can be pharmacologically targeted at the molecular level to enhance the beneficial aspects of senescence. In prostate cancer (PCa), TIS has been reported using multiple different model systems, and a more systematic analysis would be useful to identify relevant senescence manipulation molecular targets. Here we show that a spectrum of PCa senescence phenotypes can be induced by clinically relevant therapies. We found that DNA damage inducers like irradiation and poly (ADP-ribose) polymerase1 (PARP) inhibitors triggered a stable PCa-TIS independent of the p53 status. On the other hand, enzalutamide triggered a reversible senescence-like state that lacked evidence of cell death or DNA damage. Using a small senolytic drug panel, we found that senescence inducers dictated senolytic sensitivity. While Bcl-2 family anti-apoptotic inhibitor were lethal for PCa-TIS cells harboring evidence of DNA damage, they were ineffective against enzalutamide-TIS cells. Interestingly, piperlongumine, which was described as a senolytic, acted as a senomorphic to enhance enzalutamide-TIS proliferation arrest without promoting cell death. Overall, our results suggest that TIS phenotypic hallmarks need to be evaluated in a context-dependent manner because they can vary with senescence inducers, even within identical cancer cell populations. Defining this context-dependent spectrum of senescence phenotypes is key to determining subsequent molecular strategies that target senescent cancer cells.

Keywords: Prostate cancer; cellular senescence; senolytics; PARP inhibitor; enzalutamide

1. Introduction

Most prostate cancer (PCa) cases respond to first-line treatments including surgery, irradiation (XRA), and androgen deprivation therapy (ADT), but 10% will progress to metastatic castrate-resistant PCa (mCRPC) [1]. Combination radio-ADT therapies have shown improvement over single agents, suggesting that new clinical strategies can improve the efficacy of current PCa therapies [2–4]. PCa growth is stimulated by androgen receptor (AR) signaling pathways that can be directly inhibited by AR antagonists called anti-androgens (AA) [5]. Among new targeted therapies, Enzalutamide (Enza) is an emerging AA that was FDA-approved for patients with mCRPC [6–8]. Similarly, PARP inhibitors (PARPi) represent a new class of PCa anticancer agents that target cancer cells harboring DNA repair defects, including *BRCA* or *ATM* mutations [9]. PARPi olaparib (Olap) and rucaparib recently received FDA-breakthrough designations for *BRCA1/2*-mutated mCRPC [10]. However, not all patients harboring *BRCA* mutations respond well to PARPis, and their clinical use as maintenance monotherapy in ovarian cancer gives rise to resistance, suggesting a similar risk for PCa [11,12]. Therefore, understanding the cellular responses behind current PCa therapies will improve our mechanistic knowledge to identify molecular targets and improve the efficiency of emerging treatments.

Cellular senescence is a multifaceted stress response involved in tumor suppression, tissue repair, aging, as well as cancer therapy [13–16]. Key SA phenotypic hallmarks include SA- β -galactosidase (SA- β -gal) activity, persistent DNA damage response (DDR) activation; a proinflammatory secretory phenotype (SASP) constituted of cytokines (i.e., IL-6 and IL-8), growth factors and proteases; and apoptosis resistance (SAAR) through an upregulation of the Bcl-2 antiapoptotic protein family [13,17–23]. At its core, senescence is defined by a stable senescence-associated proliferation arrest (SAPA) governed by two major tumor suppressor pathways, p53/p21^{Cip1} and p16^{INK4a}/Rb [24–26]. Despite high p16^{INK4a} or p53 mutation rates, multiple evidences show that cancer cells can retain the capacity to develop some senescence-associated (SA) phenotypes in response to treatment (Therapy-induced senescence or TIS) [16,20,27–31]. Most localized (non-aggressive) PCa retain normal p53 status, suggesting that human prostate cells bypass the natural tumor suppression aspect of senescence without losing p53 functions. Alternatively, aggressive PCa almost always lack p53 functions [32]. Independent of p53 status, PCa cells can undergo TIS in response to radiotherapy and DNA-damaging chemotherapies [20,33–36] including PARPis [37,38], charcoal-mediated ADT [18] and Enza treatment [39–41].

Because the stability of the TIS proliferative arrest can be weakened by the high rates of p53 or p16 mutations in cancer cells including PCa, senescence reinforcement or manipulation strategies could reduce the risk of cancer recurrence [31,42]. Also, TIS cells that persist in tissues can create a microenvironmental niche suitable for tumor resistance [16,17,43–46], overall suggesting that the elimination of TIS cells may improve the outcome of cancer therapy. We and others have developed a “one-two punch” strategy which selectively targets TIS cells using senolytics drugs [31,47,48]. Many senolytics (i.e., piperlongumine (PPL), fisetin, quercetin + dasatinib) are efficient in improving healthy lifespan and slowing age-related diseases progression in vivo [49,50]. In the context of high-grade serous ovarian cancer and triple-negative breast cancer, we previously demonstrated that PARPi-TIS cells were particularly sensitive to Bcl-2/Bcl-xL inhibitors, including ABT-263, which triggered PARPi-TIS cells senolysis and consequently improved treatment outcomes in vitro and in vivo [31,51].

Although some therapies can trigger TIS in PCa, the SA molecular and cellular characteristics may differ depending on the treatment. It remains unclear if all types of TIS can be targeted by senolytics or manipulated in different ways for example to reinforce the senescence proliferation arrest. Here, we characterized TIS in PCa cells treated with XRA, Olap or Enza and investigated whether PCa-TIS can be eliminated using senolytics to re-direct senescent cells towards apoptosis. Using LNCaP and PC-3 cell lines respectively representing prostatic castrate-sensitive adenocarcinoma and castrate-resistant small cell neuroendocrine carcinoma (SCNC) metastatic cells [52], we found that XRA- and Olap-TIS cells were

targetable using Bcl-2 family inhibitors while Enza-TIS cells resisted such senolysis. Interestingly, the previously described senolytic PPL acted to reinforce Enza-TIS proliferation arrest without triggering cell death. This suggests that multiple layers of PCa-TIS manipulation may advance new treatment strategies for mCRPC when used in pre-defined contexts.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Culture Conditions

PCa cell lines PC-3 and LNCaP given by Dr. Fred Saad's laboratory (CRCHUM) were cultured in RPMI (350-000-CL, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) supplemented with 10% FBS (12483, Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (450-201-EL, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), and maintained at 37 °C in 20% O₂ and 5% CO₂ conditions.

2.2. Drugs

Olaparib/Olap (AZD2281) and A-1155463/A-115 (S7800) were purchased from Selleckchem, Houston, TX, USA. ABT-263 (Navitoclax, A3007) and enzalutamide/Enza (MDV3100, A3003) were from APEX BIO, Houston, TX, USA. Drugs were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in complete culture media for in vitro experiments. Drugs were added 48 h after seeding and Enza treatment was renewed every 3 days for all experiments. For long-term Enza treatments, cells were cultured in RPMI media supplemented with 10 µM Enza for 12, 18, 24 or 30 days in T175 flasks and transferred to 6-, 24- or 96-well plates for different experiments.

2.3. Irradiation

Cells were X-irradiated with a total dose of 8 Gy at rates equal to or above 0.75 Gy/min using Gammacell® 3000 irradiator Elan.

2.4. IncuCyte® Cell Proliferation Phase-contrast Imaging Assay

To evaluate cell proliferation, 1500 cells per well were seeded in 96-well plates (all cells expressing H2B-GFP). Cells were incubated with PARPi, Enza and senolytic drugs in adjusted 0.75% DMSO. Cell number was imaged by phase contrast and fluorescence using the IncuCyte® Live-Cell Imaging System (Essen BioScience Inc, Ann Arbor, MI, IncuCyte zoom). Frames were captured at 6-h intervals in three independent wells using a 10× objective. Proliferation growth curves were constructed using IncuCyte® Zoom software (Essen BioScience Inc, Ann Arbor, MI, V2019B) from measurements of H2B-GFP cell nuclei numbers. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.

2.5. SA-β-galactosidase Detection

SA-β-gal assay was performed as previously described [53]. Briefly, cells grown in 6-well plates were washed with 1X PBS, fixed with 10% formalin for 5 min, washed again with PBS and incubated at 37 °C for 16 h in a staining solution composed of 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-inolyl-β-galactosidase in dimethylformamide (20 mg/mL stock), 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 40 mM citric acid/sodium phosphate and 2 mM MgCl₂, at pH 6.0. Cells were washed with PBS, fixed with 10% formalin for 10 min, and washed again with PBS. Pictures were taken for quantification.

2.6. Immunofluorescence

LNCaP and PC-3 cells were seeded onto coverslips in 24-well plates, treated 48 h after seeding, and grown for 6 days. Cells were fixed in formalin for 10 min at room temperature (RT) and permeabilized in 0.25% Triton in PBS for 15 min. Slides were blocked for 1 h in PBS containing 1% BSA and 4% donkey serum. Primary antibodies (53BP1, Novus, Saint Charles, MI, USA, NB100-305; γ H2AX, Millipore, Burlington, MA, USA, JBW301) diluted in blocking buffer were added and slides were incubated overnight at 4 °C. Cells were washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at RT, then washed again. Coverslips were mounted onto slides using Prolong[®] Gold anti-fade reagent with DAPI (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). Images (400 \times magnification) were obtained using a Zeiss microscope AxioObserver Z1, Carl Zeiss, Jena, Germany. Automated analysis AxioVision[™] software from Zeiss, Jena, Germany (AxioVision SE64 Rel. 4.9.1) was used to count foci to calculate the average number of foci per nucleus. The fold change was calculated as the ratio between percentages of γ H2AX or 53BP1 nuclear foci in treated versus control (non-treated) cells. γ H2AX and 53BP1 foci were quantified in > 150 nuclei from three different fields of each coverslip.

2.7. Cell Cycle and Cell Death Analysis by Flow Cytometry

LNCaP and PC-3 cells were seeded in 6-well plates and treated 48 h after seeding, then harvested 6 days after. For cell cycle analysis, live cells were fixed for 24 h in 70% ethanol and incubated for 30 min at RT with 100 μ g/mL RNase A and 25 μ g/mL propidium iodide. For cell death analysis, cells were incubated 5 min at RT with DRAQ7 (ab109202, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA). A maximum of 30,000 events were counted per condition using the Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and analyzed with FlowJo software (Ashland, OR, USA, V10).

2.8. EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Detection

To detect DNA synthesis, cells were seeded onto coverslips in 24-well plates and treated 24 h after seeding. EdU (10 μ M, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to the medium and incubated for 24 h before the end of drug treatment on days 2 or 6. Cells were washed three times with TBS and fixed with 10% formalin for 10 min. EdU staining was assessed using the Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 647 Imaging Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Coverslips were mounted onto slides using Prolong[®] Gold anti-fade reagent with DAPI (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). Images were obtained using a Zeiss microscope and automated analysis software from Zeiss was used to count foci.

2.9. Drug Combination Analysis

LNCaP and PC-3 cells were infected with lentiviruses encoding H2B-GFP and treated with the different combination treatments. Cell number was imaged by phase contrast and fluorescence using the IncuCyte[®] Live-Cell Imaging System (IncuCyte HD). For each concentration of senolytic drug, the senolytic index (SI) was calculated as follows: $SI = [(N_f / N_i) SX / (N_f / N_i) S_0] \text{ No PARPi} / [(N_f / N_i) SX / (N_f / N_i) S_0] \text{ PARPi}$, where N_f = Final cell number; N_i = initial cell number; SX = X concentration of the senolytic; and S_0 = no senolytic.

2.10. Cloning, Viruses and Infections

Viruses were produced as described previously and titers were adjusted to achieve ~90% infectivity [13]. Infections were followed 48 h later by puromycin or hygromycin selection and stable cells were either used or stored at -80 °C. Lentiviruses encoding H2B-GFP were produced by amplification of the H2B sequence from the pENTR1A-H2B-HcRed plasmid (a gift from Dr. Richard Bertrand, CRCHUM, Canada) using the following primers: ES-92 (5'-GGTACCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTCTGCT-3') and ES-

93 (5'-GGATCCTAGCGCTGGTGTACTTGGTGATGG-3'). The amplified product was digested with restriction enzymes Kpn1/BamH1 and inserted into the entry vector pENTR1A-GFP-N2 (FR1) to generate pENTR1A-H2B-GFP, which was recombined into the destination vector (pLenti PGK Hygro Dest (W530-1)) to obtain the final lenti-H2B-GFPygro lentivector.

2.11. Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

Total RNA was extracted from harvested cells using the RNeasy kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). One microgram of total RNA was subjected to reverse transcription using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). One microliter of the reverse-transcribed product was diluted (1:10) and subjected to Q-PCR using sequence specific primers (400 nM) and the SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems®, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). Q-PCR was performed using Applied BioSystems® Step One Plus apparatus (UDG activation 50 °C/2 min, followed by AmpliTaq activation plus denaturation cycle 95 °C/2 min, followed by 40 cycles at 95 °C/15 s, 60 °C/1 min and 72 °C/30 s). Gene expression values were normalized to TATA-binding protein gene expression. Three independent experiments were performed in duplicate. Sequence primers for target genes are described in Supplementary Table S1.

2.12. Preparation of Conditioned Media and Analysis of Secreted SASP Factors

Treated cells were seeded in 6-well plates (100000 cells per well) and irradiated 24 h after seeding. Untreated cells were similarly seeded 48 h before the preparation of conditioned media as previously described [54]. Briefly, cells were washed three times with serum-free medium 8 days after irradiation, followed by incubation in serum-free RPMI medium containing antibiotics for 16 h. Cells were manually counted and conditioned media was stored at -80 °C until assayed. Conditioned media was analyzed using the multiplex electrochemiluminescence immunoassay system for 40 secreted factors using the V-Plex human kit from Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MD, USA; #K15209D) following the manufacturer's instructions as performed previously [31]. The results are reported as concentrations of target protein normalized to cell number.

3. Results

3.1. Irradiation and olaparib trigger senescence-associated phenotype in LNCaP cells

To investigate the impact of XRA and Olap treatment on PCa cell fate decisions, we selected LNCaP, a metastatic, androgen-dependent, p53 wild-type PCa cell line that is characteristic of human prostatic adenocarcinoma [52,55]. LNCaP proliferation was arrested by XRA (Figure 1A, Figure S1A) or reduced by Olap treatment in a dose-response relationship (Figure 1B, SI1A). Less than 10% cumulative cell death was observed by flow cytometry 6 days after both treatments (Figure 1C, SI1B). DNA content assessed by propidium iodide showed that the G2 cell population of LNCaP was strongly increased and less than 1% of cells were in S-phase (Figure 1D, Figure S1C). Moreover, less than 5% of cells had aneuploidy (8N) (Figure 1D, Figure S1C) suggesting that XRA or Olap triggered only mild genomic instability. Within 24 h of treatment, 80% of cells were already negative for DNA synthesis and remained negative for up to 6 days post-treatment, demonstrating stable proliferation arrest (Figure 1E, Figure S1D). Furthermore, most LNCaP cells were positive for SA- β -gal activity suggesting that XRA and Olap triggered senescence in LNCaP (Figure 1F, Figure S1E). These senescent cells displayed persistent DNA double strand-breaks damage foci labelled by 53BP1 and phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) [56] (Figure 1G), and increased expression of SA genes, including the cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) p21, p16 and p15 (Figure 1H). Expression of typical SASP components such as IL-6, IL-8 or IL-1 α were not significantly increased

following XRA or Olap treatments except for IL-1 β (Figure 1I). A multiplex assay showed that the secretion of only a few SASP factors like VEGF, MCP-1 or IL-8 were increased in the conditioned media of irradiated LNCaP (Figure S1F). Altogether these data show that XRA and Olap mainly trigger a DNA damage-induced senescence phenotype in LNCaP cells.

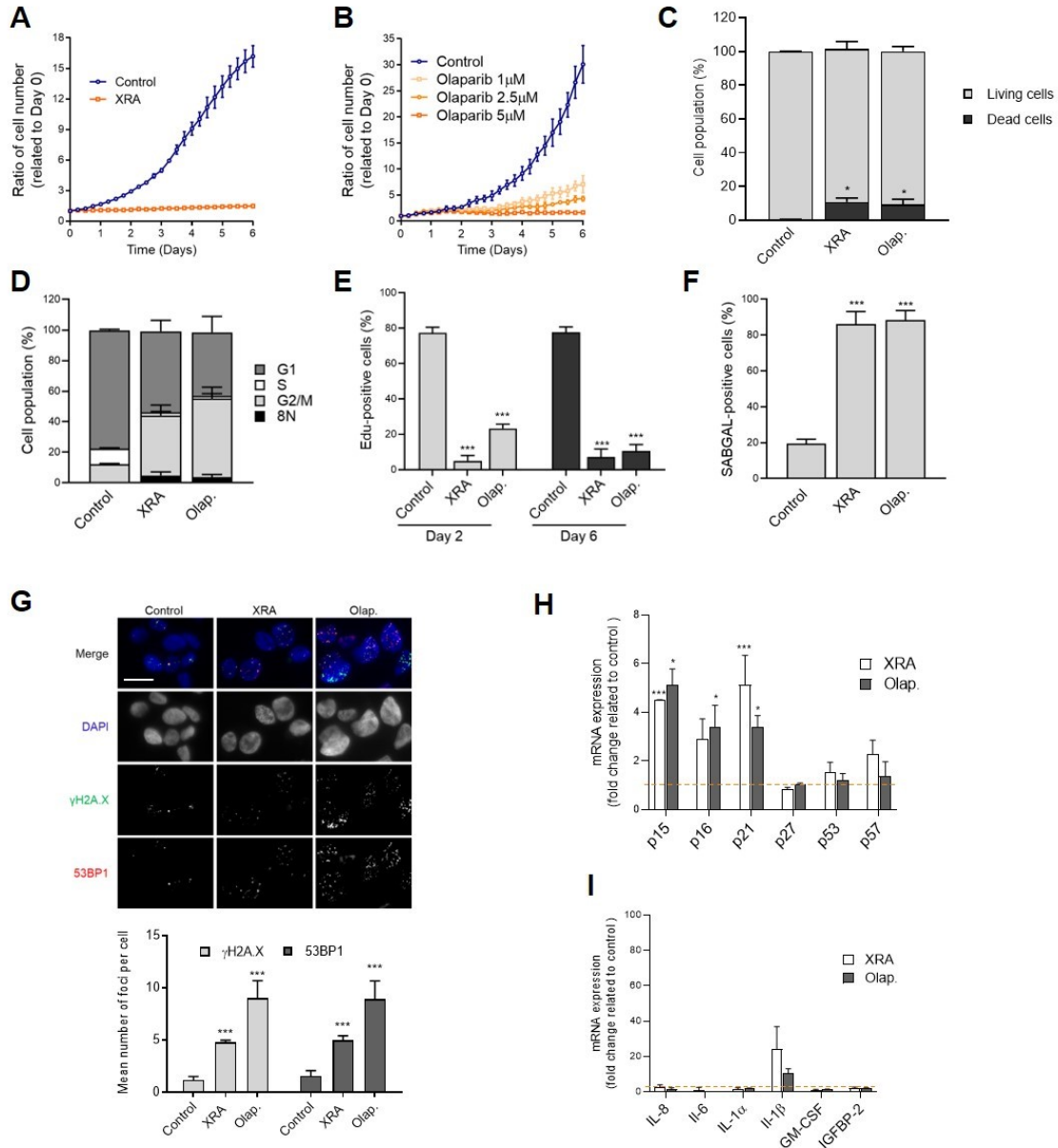


Figure 1. Therapy-induced DNA damage triggers senescence in LNCaP cells. (A–B) Cell proliferation curves of LNCaP expressing H2B-GFP and (A) irradiated with 8 Gy of X-Rays (XRA) or (B) treated with increasing concentrations of olaparib (Olap). Data are the mean \pm SD of triplicate and are representatives of three independent experiments. (C) LNCaP cells were irradiated with 8 Gy XRA or treated with 5 μ M Olap. (C) The cumulative cell death of LNCaP was analyzed by flow cytometry 6 days after XRA or Olap treatment. (D) Flow cytometry analysis of cell cycle populations following 6 days of exposure of LNCaP cells to XRA or Olap. (E) Cell proliferation was assessed by incorporation of EdU for 24 h at 1 or 5 days after XRA or Olap treatment. (F) SA- β -gal assay was performed on LNCaP cells 6 days after XRA or Olap treatment. (G) Representative images (top) and quantifications (bottom) of γ H2AX (green) and 53BP1 (red) foci per nucleus

in LNCaP cells 6 days following XRA or Olap treatment. The merged red and green channels show colocalization in yellow and DAPI is shown in blue. Scale bar = 20 μ M (H-I) Relative mRNA levels of (H) CDKi or (I) SASP factors were evaluated by real-time Q-PCR in LNCaP cells irradiated or treated with Olap for 6 days. The values represent the fold change expression related to non-treated controls (represented by the dashed line). (C-I) The mean \pm SD of three independent experiments is shown. Statistical analysis: (C,E,F,G) two-tailed Student's *t*-test; (H,I) two-way ANOVA. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

3.2 Irradiation and olaparib trigger senescence, cell death and mitotic catastrophe in PC-3 cells

To investigate the cell fate decisions of more aggressive PCa cells in response to radiotherapy and Olap, we selected PC-3, a metastatic, p53-mutated PCa cell line that harbours characteristics of prostatic SCNC [52]. Similar to LNCaP cells, we observed stable proliferation arrest of PC-3 cells in response to XRA (Figure 2A, Figure S2A) and dose-response reduction of proliferation induced by Olap, although the Olap response was slower compared to LNCaP (Figure 2B, Figure S2A; Figure 1B, Figure S1A). In contrast to LNCaP, a mix of living attached cells and floating dead cells (about 30% cumulative) were observed 6 days after both treatments (Figure 2C, Figure S2A and Figure S2B). The remaining living cells were mostly accumulated in G2 phase with practically no cells in S-phase (Figure 2D, Figure S2C). Importantly, about 20% of the treated PC-3 cells were aneuploid (8N) (Figure 2D, Figure S2C), suggesting that a mitotic catastrophe occurred in these cells. Indeed, some characteristics of mitotic catastrophe including DNA synthesis (EdU-positive cells) 2 days post-treatment (Figure 2E, Figure S2D) and abnormal nucleus content (multiple nuclei or micronuclei) (Figure 2G, Figure S2D) were observed in XRA- and Olap-treated PC-3 cells. In addition to cell death, mitotic catastrophe can also promote senescence [57]. At 6 days post-treatment, 90% of living PC-3 cells were negative for EdU-pulse labeling, demonstrating stable proliferation arrest (Figure 2E, Figure S2D). About 30% of the cells were positive for SA- β -gal activity (Figure 2F, Figure S2E) and most displayed persistent DNA damage foci (Figure 2G). Finally, we observed an over-expression of SA genes in treated PC-3 cells, including CDKi (Figure 2H) and several SASP factors (Figure 2I). As we have previously seen for other types of senescent cancer cells [31], a high level of many secreted SASP factors including IL-6 and IL-8 was detected in the conditioned media of irradiated PC-3 cells by multiplex assay, suggesting that the low-level SASP observed in LNCaP cells is not related to prostate cancer in general (Figure S2F). Hence, DNA damage treatments XRA and Olap trigger a mitotic catastrophe process in the SCNC PC-3 cell line, resulting in genomic instability, cell death and a high proportion of senescent cells.

3.3 Combination of irradiation or PARPi treatments with senolytics

We investigated whether XRA- and Olap-induced TIS cells could be eliminated using a small panel of senolytic drugs. We selected two inhibitors of the Bcl-2 family: ABT-263 (navitoclax), which inhibits both Bcl-2 anti-apoptotic family members Bcl-2 and Bcl-xL; and A-1155463 (A-115), which targets selectively Bcl-xL. We also selected piperlongumine (PPL), a natural product that selectively kills senescent cells including senescent ovarian cancer cells [31,49]. To highlight the senolytic sensitivity of PCa-TIS cells, we used a single dose of XRA (8 Gy) or Olap (5 μ M) in LNCaP and PC-3 to induce an optimal response of senescence in combination with increasing concentrations of ABT-263, A-115 or PPL (concentrations given in Figure S3A). For each combination, surviving cells were counted after 6 days of treatment (Figure 3A and B, Figure S3B and Figure S4A) and the synergistic effect of the combination was evaluated using the Bliss independent model [58] in which negative values indicate antagonism, values around zero indicate additive effects and positive values indicate synergy (Figure S4B). Interestingly, most of the ABT-263 and A-115 concentrations worked in synergy with XRA and Olap to reduce LNCaP and PC-3 cell numbers, but not PPL (Figure S4B). To determine whether ABT-263, A-115 or PPL selectively targeted XRA- or Olap-TIS in LNCaP and PC-3 cells, we compared the number of surviving cells in response to senolytics for each senescence inducer (Figure 3A and B, Figure S4A). We also calculated a senolytic index (SI) as we previously described [31]. SI

is based on the ratios of surviving cells (over control) for each combination in order to reflect the capacity of senolytic drugs to specifically eliminate senescent cells (Figure 3C and D). The SI for most of the ABT-263 and A-115 concentrations, but not for PPL, were elevated in LNCaP and PC-3 cells (Figure 3C and D). Finally, to confirm that ABT-263 and A-115 induced cell death in XRA- or Olap-TIS cells, we analyzed cumulative cell death after 6 days of treatments (Figure 3E and F, Figure S4C). The combination of 0.625 μ M ABT-263 or 0.3125 μ M A-115 with XRA or Olap increased cell death up to 80% in PC-3 and LNCaP cells (Figure 3E and F, Figure S4C). Altogether these data show that the Bcl-2 family inhibitors (ABT-263 and A-115) but not PPL can be used as senolytics to trigger cell death in XRA- or Olap-TIS PC-3 and LNCaP cells.

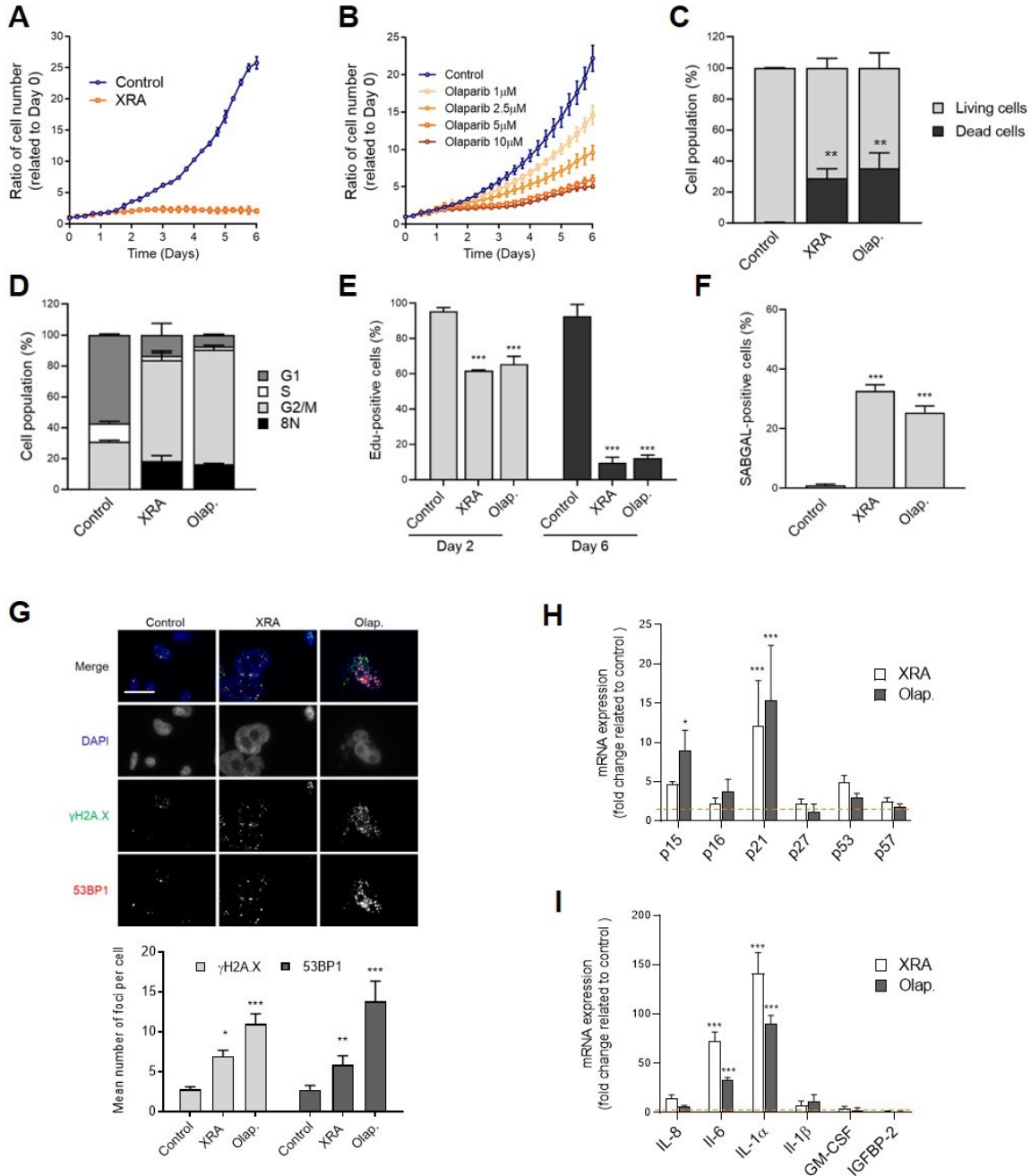


Figure 2. Therapy-induced DNA damage triggers mixed cell fates in PC-3 cells (A–B) Cell proliferation curves of PC-3 expressing H2B-GFP and (A) irradiated with 8 Gy of X-rays (XRA) or (B) treated with increasing concentrations of olaparib (Olap). (C–I) PC-3 cells were irradiated with 8 Gy XRA or treated with 5 μ M Olap. Data are the mean \pm SD of triplicate and are representatives of three independent experiments. (C) The cumulative cell death of PC-3 was analyzed by flow cytometry 6 days after XRA or Olap treatment. (D) Flow cytometry analysis of cell cycle populations following 6 days of exposure of PC-3 cells to XRA or Olap. (E) Cell proliferation was assessed by incorporation of EdU for 24 h at 1 or 5 days after XRA or Olap treatment. (F) SA- β -gal assay was performed on PC-3 cells 6 days after XRA or Olap treatment. (G) Representative images (top) and quantifications (bottom) of γ H2AX (green) and 53BP1 (red) foci per nucleus in PC-3 cells 6 days following XRA or Olap treatment. The merged red and green channels show colocalization in yellow and DAPI is shown in blue. Scale bar = 20 μ M (H–I) Relative mRNA levels of (H) CDKi or (I) SASP factors were evaluated by real-time Q-PCR in PC-3 cells irradiated or treated with Olap for 6 days. The values represent the fold change expression related to non-treated controls (represented by the dashed line). (C–I) The mean \pm SD of three independent experiments is shown. Statistical analysis: (C,E,F,G) two-tailed Student's *t*-test; (H,I) two-way ANOVA. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

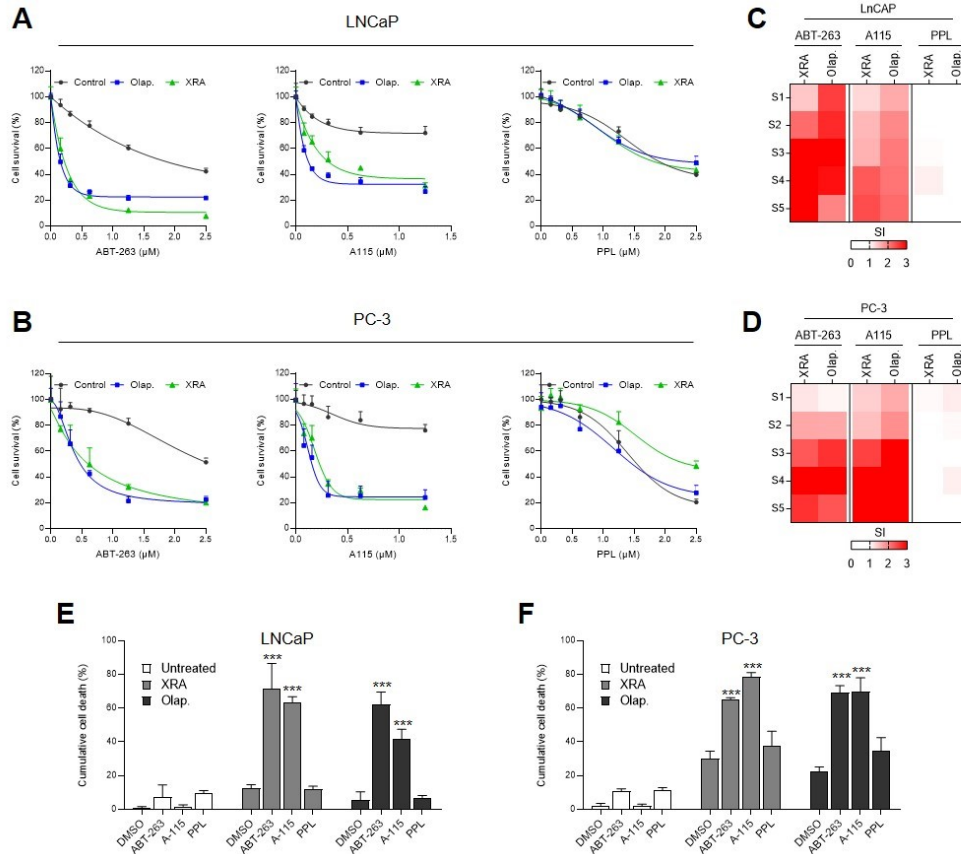


Figure 3. Bcl-2 family senolytics synergize with irradiation and olaparib. (A–D) LNCaP and PC-3 were infected with lentiviruses expressing H2B-GFP and treated with 8 Gy of X-Rays (XRA) or 5 μ M olaparib (Olap) for 6 days, alone or in combination with increasing concentrations of ABT-263 (left), A-1155463 (A-115; middle) or PPL (right). Cell survival curves of LNCaP (A) or PC-3 (B) for the different combination treatments. Heat maps of senolytic indexes (SI) for LNCaP (C) or PC-3 (D) treated with the indicated combination treatments. S1 to S5 correspond to increasing senolytic concentrations (see Figure S3A). (E–F) The cumulative cell death of (E) LNCaP and (F) PC-3 were analyzed by flow cytometry 6 days after 8 Gy XRA or following 6 days' exposure to 5 μ M Olap, alone or in combination with 0.625 μ M ABT-263, 0.3125 μ M A-115 or 0.625 μ M PPL. (A–B) Data are the mean \pm SD of triplicate and are representatives of three

independent experiments. (C–F) The mean \pm SD of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tailed Student's t-test. *** $p < 0.001$.

3.4 Enza triggers a senescence-like state in LNCaP cells that is resistant to Bcl-2 family senolytics

Enza is a second-generation AA treatment for both non-metastatic PCa and mCRPC. Enza directly binds to the AR to inhibit its activity and prevent tumor growth [59–61]. Although Enza can trigger senescence in LNCaP cells [39–41], the characterization of Enza-TIS senescence hallmarks remains poorly described. We treated LNCaP (androgen-sensitive) cells with increasing concentrations of Enza and analyzed the impact on cell proliferation using live-cell imaging. We found that 10 μ M of Enza was sufficient to effectively block LNCaP proliferation (Figure 4A, Figure S5A) but contrary to XRA or Olap, Enza did not trigger any detectable cell death in LNCaP (Figure 4B, Figure S5B). The vast majority of Enza-treated cells were enriched in the G1 cell cycle phase after 12 days of treatment with complete absence of abnormal DNA content (8N), suggesting that Enza did not induce mitotic catastrophe in LNCaP cells (Figure 4C–D, Figure S5C–D). Importantly, the percentage of SA- β -gal positive cells gradually increased over time with Enza exposure, suggesting a slow induction of senescence (Figure 4E, Figure S5E) but contrary to XRA or Olap treatments (Figure 1G and 2G), Enza did not increase the number of persistent DNA damage foci even after 12 days of treatment (Figure 4F). We observed that Enza increased the expression of p15, p16 and IL-1 β (Figure 4G) but not of p21 as in XRA- or Olap-TIS cells (Figure 1H and 2H). These results suggest that Enza triggered a senescence-like phenotype without DNA-damage in LNCaP.

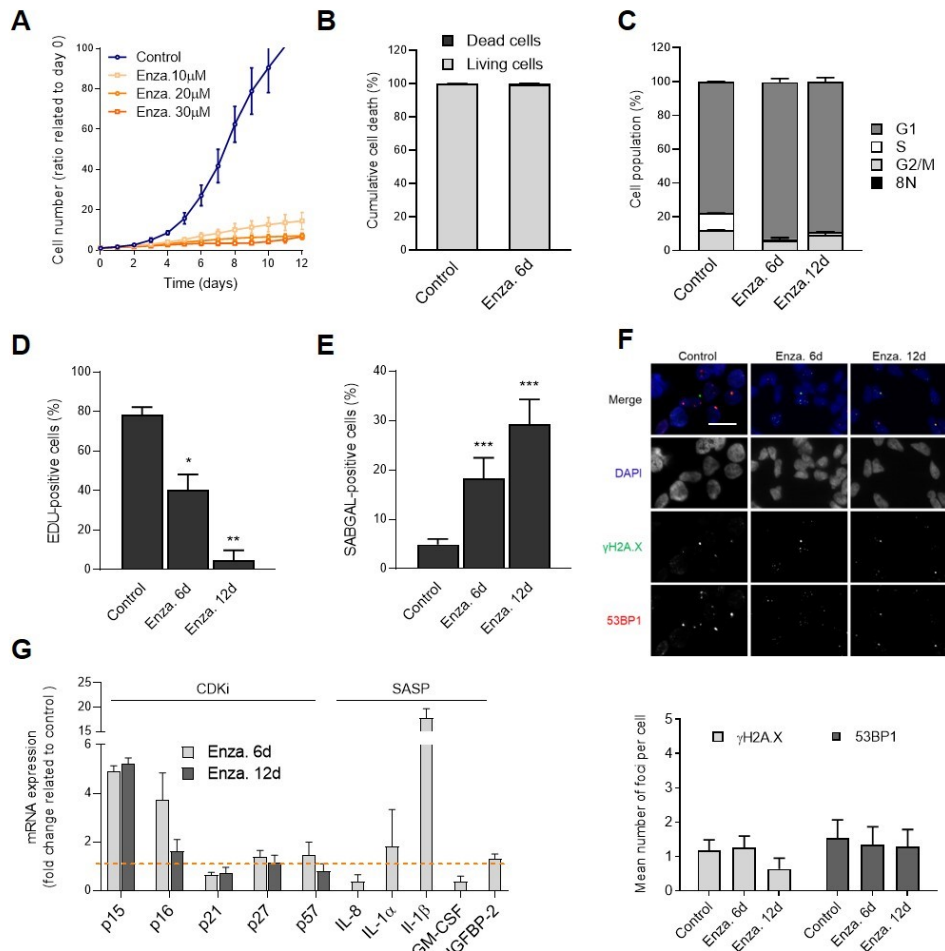


Figure 4. Enzalutamide triggers a senescence-like state in LNCaP cells. **(A)** Cell proliferation curves of LNCaP expressing H2B-GFP and treated with increasing concentrations of enzalutamide (Enza). Data are the mean \pm SD of triplicate and are representatives of three independent experiments. **(B)** The cumulative cell death of LNCaP was analyzed by flow cytometry 6 days after 10 μ M Enza exposure. **(C)** Flow cytometry analysis of LNCaP cell cycle populations following 6 or 12 days' exposure to 10 μ M Enza. **(D)** Cell proliferation was assessed by incorporation of EdU for 24 h at 5 or 11 days after 10 μ M Enza exposure. **(E)** SA- β -gal assay was performed 6 or 12 days after 10 μ M Enza exposure. **(F)** Representative images (top) and quantifications (bottom) of γ H2AX (green) and 53BP1 (red) foci per nucleus in LNCaP cells 6 days following 6 or 12 days exposure to 10 μ M Enza. The merged red and green channels show colocalization in yellow and DAPI is shown in blue. Scale bar = 20 μ M **(G)** Relative mRNA levels of CDKi and SASP factors were evaluated by real-time Q-PCR in LNCaP cells exposed to 10 μ M Enza for 6 or 12 days. The values represent the fold change expression related to non-treated controls (represented by dashed line). **(B–F)** The mean \pm SD of three independent experiments is shown. Statistical analysis: **(B,C,D,E,F)** two-tailed Student's t-test; **(G)** two-way ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

We then investigated whether Enza-TIS LNCaP cells could be targeted with senolytics. We treated LNCaP cells with 10 μ M Enza for 6 or 12 days, in combination with increasing concentrations of ABT-263, A-115 or PPL for the last 6 days (concentrations in Figure S3A, Figure S6A). For each combination, surviving cells were counted (Figure S6B) and the synergistic effect of the combination was evaluated by calculating a Bliss score (Figure 5A). PPL but not ABT-263 or A-115 synergistically decreased the number of cells treated with Enza for 6 days (Figure 5A). Intriguingly, this synergetic effect of PPL was partially lost after 12 days of combinatory treatment (Figure 5A). We also compared the effect of the senolytics on LNCaP cells by evaluating the percentage of cell survival (Figure 5B) and by calculating the SI (Figure 5C). Except for the highest dose of PPL at day 6, most of the combinations revealed low SI synergy, suggesting PPL acted on cell proliferation rather than survival (Figure 5C). Consistently, we did not observe significantly increased cell death in Enza-TIS cells following ABT-263, A-115 or PPL treatments (Figure 5D). This demonstrates that Enza-senescent LNCaP cells are not sensitive to inhibitors of the Bcl-2 antiapoptotic family but that PPL may act as a senomorphic or seno-modulator by reinforcing the Enza-induced proliferation arrest.

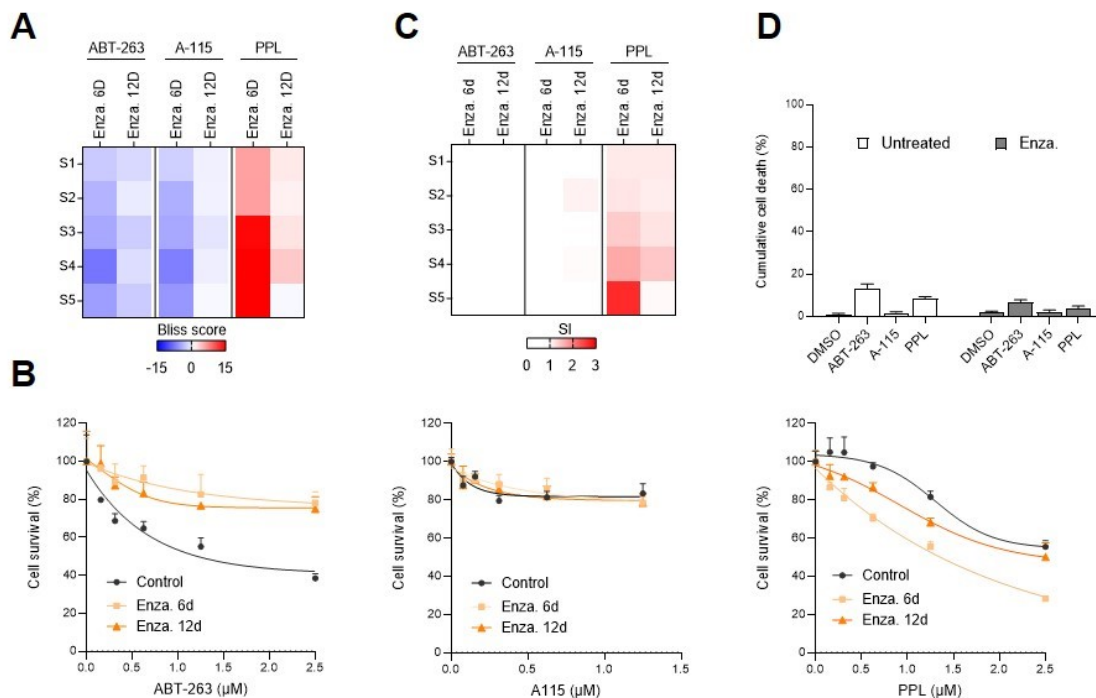


Figure 5. Enza-TIS cells are not sensitive to senolytics. (A–D) LNCaP expressing H2B-GFP were treated with 10 μM enzalutamide (Enza) for 6 or 12 days, alone or in combination with increasing concentrations of ABT-263 (left), A-1155463 (A-115, middle) or PPL (right). (A, C) Heat maps of bliss scores (A) and senolytic indexes (SI) (C) for LNCaP treated with the indicated combination treatments. S1 to S5 correspond to increasing senolytic concentrations (see Figure S3A). (B) Cell survival curves of LNCaP expressing H2B-GFP and treated with the indicated combination treatments. (D) The cumulative cell death of LNCaP was analyzed by flow cytometry 6 days after 10 μM Enza exposure, alone or in combination with 0.625 μM ABT-263, 0.3125 μM A-115 or 0.625 μM PPL (A, C and D). The mean ± SD of three independent experiments is shown. (B) Data are the mean ± SD of triplicate and are representatives of three independent experiments. Data were analyzed using the two-tailed Student’s *t*-test.

3.5 Senescence-like state induced by enzalutamide is reversible

Since senescence phenotypes can develop over extended periods [10,62,63], we examined if long-term Enza treatment could lead to DNA damage and ABT-263 or A-115 sensitivity. We exposed LNCaP cells to 10 μM Enza for 18, 24 or 30 days and evaluated the evolution of SA markers by performing cell fate characterization experiments. Compared to 12 days’ Enza-treated LNCaP, the percentage of SA-β-gal positive cells (about 30%; Figure 6A and Figure S5E) and EdU-positive cells (under 20%; Figure 6B and Figure S5D) remained stable. We did not observe any significant changes in the number of 53BP1 and γH2AX foci between the different time points, which suggests that the phenotypes observed at 12 days did not evolve over time (Figure S5F-H). In contrast to XRA treatments for which a single dose led to stable proliferation arrest for at least 6 days, the release of Enza treatment for 6 days after 12, 18 or 24 days treatments led to resumption of DNA synthesis, nearly to the same level of untreated control cells (Figure 6C). This suggests that the senescence-like state induced by Enza is reversible. Accordingly, long-term Enza-treated LNCaP cells resumed their proliferation when Enza was released for 9 days after 12, 18, 24 or 30 days of treatment, albeit longer treatments required a longer recovery (Figure 6D and E). We also observed that increasing concentrations of ABT-263, A-115 or PPL for the last 6 days of the 18, 24 and 30 days of Enza

treatment did not lead to a synergistic decrease of cell viability (Figure 6F and G). On the contrary, long-term Enza-treated LNCaP cells were more resistant to senolytic concentrations that normally lead to cell death in untreated control cells (Figure 6F and G).

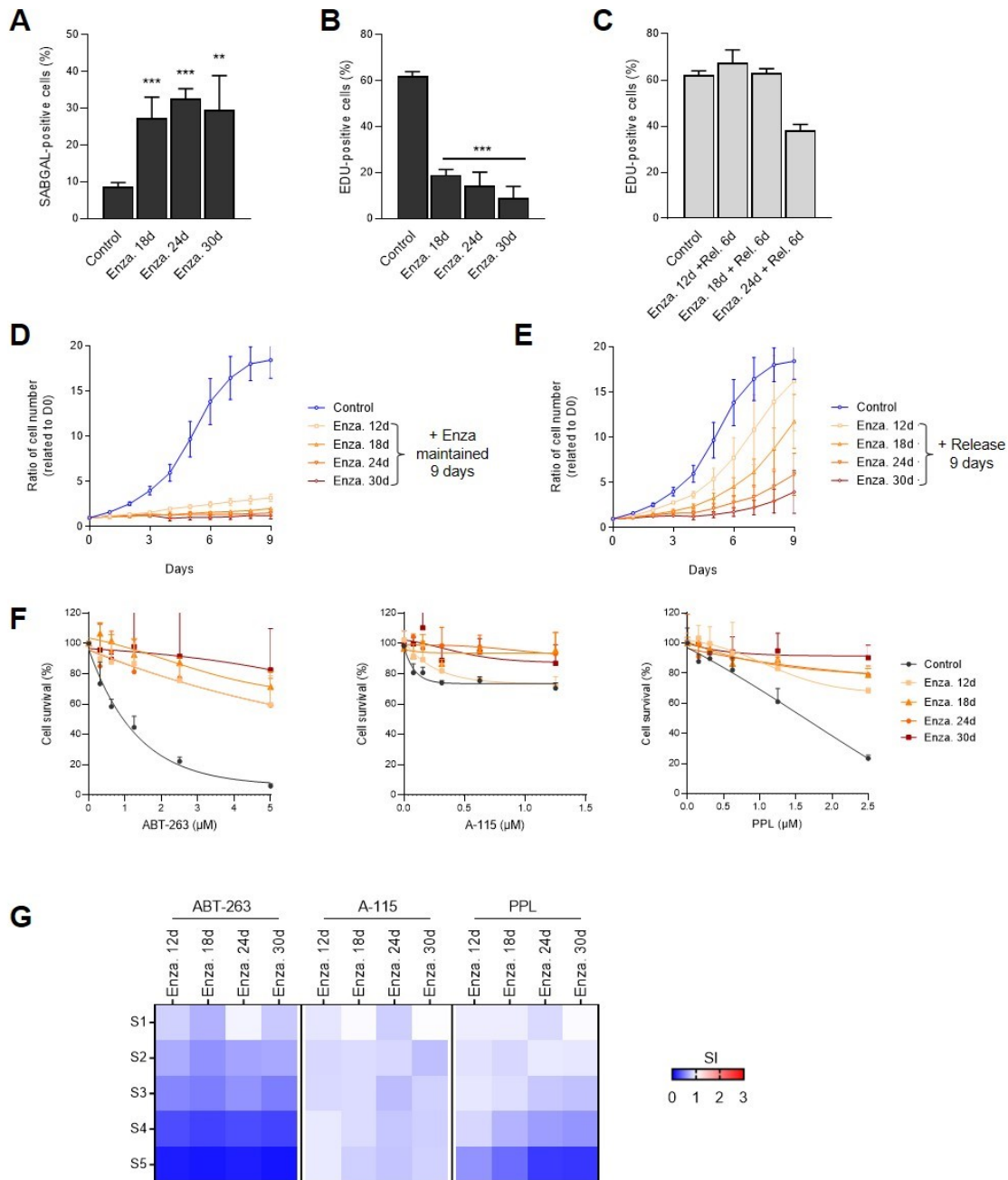


Figure 6. Enza-TIS is reversible. (A) SA-β-gal assay and (B) quantification of EdU-positive cells were performed in LNCaP cells following 18, 24 or 30 days of enzalutamide (Enza) treatment. (C) EdU staining was performed in LNCaP for which 10 μM Enza was released during the last 6 days of long-term Enza treatment. Cells were pulsed 24 h before the staining. (A–C) The mean ± SD of three independent experiments is shown (D–E) LNCaP cells expressing H2B-GFP were exposed to 10 μM Enza for 12, 18, 24 or 30 days and cell proliferation curves were determined for 9 days while Enza was (D) maintained or (E) released. Data are the mean ± SD of triplicate and are representatives of three independent experiments. (F) LNCaP expressing

H2B-GFP were exposed to 10 μ M Enza for 12, 18, 24 or 30 days, and then cell survival curves were determined during a 6-day exposure to Enza, alone or in combination with increasing concentrations of ABT-263 (left), A-1155463 (A-115, middle) or PPL (right). Data are the mean \pm SD of triplicate and are representatives of three independent experiments. (G) Heat maps of senolytic indexes (SI) for LNCaP treated with the indicated combination treatments. S0 to S5 correspond to increasing senolytic concentrations (see Figure S3A). The mean \pm SD of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tailed Student's *t*-test. ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Cancer is associated with the presence of mutated or defective cell cycle checkpoints that can alter therapy-induced cell fate decisions, shifting away from apoptosis or senescence and towards crisis and mitotic catastrophe [64,65]. Despite these mutations, cancer cells can often retain the capacity to enter senescence in response to treatments [16,20,29,30]. In PCa, DNA damaging chemotherapy, radiotherapy [20,33–38,66], ADT [18,67–70] or Enza [39–41] can induce TIS, suggesting that PCa-TIS is a relevant target to enhance treatment outcomes.

Here, we demonstrate that different PCa therapies can promote senescence phenotypes in PCa cells but with major differences in SA phenotypic characteristics. The DNA damage inducers, XRA and Olap, triggered classical TIS in PCa cells in addition to the mitotic catastrophe and cell death observed in PC-3 cells. Although mitotic catastrophe could be explained by differences in cell cycle regulation, particularly those related to the p53 status, no causal link can be established yet due to the many other genomic differences that exist between PC-3 and LNCaP [71]. LNCaP cells have increased levels of p15, p16 and p21 CDKi transcripts, but PC-3 cells only express p21. This observation could be partially explained by higher levels of CBX7, a repressor of the p16^{INK4a}/p14^{ARF} *CDKN2A* locus [68,72], found in PC-3 cells. Also, regulation of p21 in the p53-mutated PC-3 cell line is mediated by FOXO proteins [73], which are implicated in senescence [74,75], PCa growth and malignancy [76–80], and have been shown to be upregulated following PARP inhibition [81]. Similarly, the DDR checkpoint protein Chk2 is known to promote senescence through a p53-independent activation of p21 transcription in breast carcinoma, high grade serous ovarian cancer or immortalized keratinocyte cells [31,82].

Alternatively, Enza also induced TIS in androgen-sensitive LNCaP cells in the absence of direct DNA damage. In addition to DNA damage, we show that Enza-TIS cells did not exactly share other SA markers observed in XRA- or Olap-senescent cells as they displayed: (i) a more gradual loss of DNA synthesis with an accumulation of cells in G1 phase; (ii) no more than 30% SA- β -gal positive cells; (iii) a complete absence of additional DNA damage foci or genomic instability; (iv) increased p16 but not p21 expression, and (v) a reversible proliferation arrest. Indeed, although p16 expression is often associated with an irreversible state of senescence [24,25], Enza treatment for more than 30 days sustained a senescence that was rapidly reversible upon drug removal, suggesting that Enza-TIS depends on different underlying molecular mechanisms for both induction and maintenance when compared to DNA damage-TIS. Although overall Enza-TIS was reversible, we noted that longer Enza treatment yielded incrementally slower proliferation recovery (Figure 6E), suggesting that either cells acquired altered (slower) cell cycle characteristics or an increasing proportion of cells are converted to a stable form of senescence over time. Interestingly, some reports showed that androgen depletion using charcoal-stripped serum induced senescence with persistent DNA damage foci in LNCaP cells via reactive oxygen species production [18,67–70], which contrasts to what we and others observed for Enza-TIS [40]. Charcoal-stripped androgen depletion TIS was associated with the upregulation of p27^{Kip1} via the downregulation of its proteolysis through reduced activity of the E3 ligase Skp2 [67,68]. We did not measure p27^{Kip1} protein levels but the absence of p27^{Kip1} transcripts that we observed in Enza-TIS is consistent with this transcription-independent mechanism of regulation. Although it remains unclear why charcoal-stripped androgen depletion and Enza TIS are different, we can

suggest that perhaps charcoal depletes other growth-survival factors. Nevertheless, Enza is currently used in clinic and understanding Enza-TIS is particularly timely.

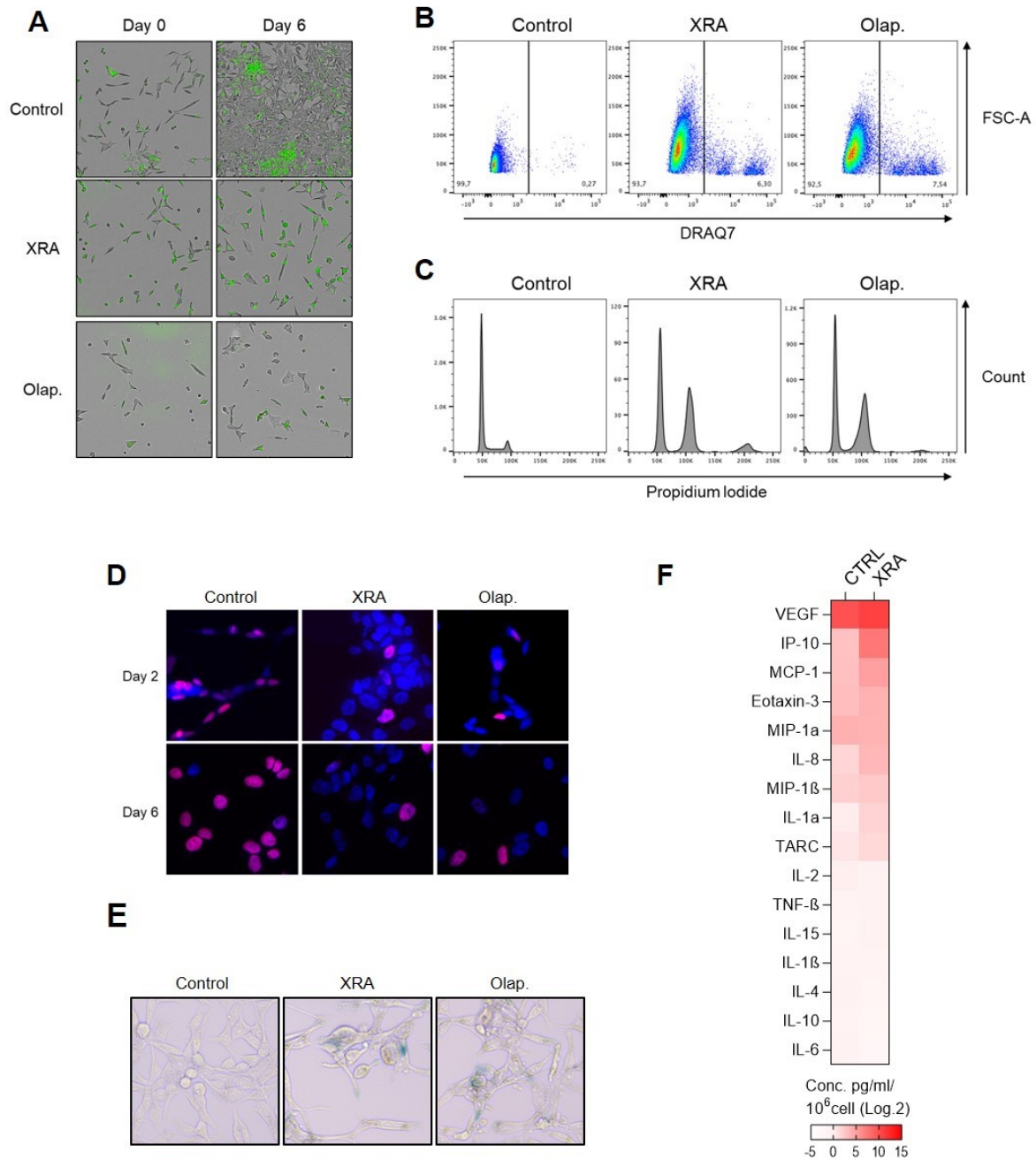
We and others have proposed to manipulate senescence to improve cancer treatment using a “one-two punch” strategy [30,31,83,84]. This strategy targeting TIS cancer cells with senolytics has shown success in breast, ovarian, melanoma and liver cancers [31,85]. However, senolytics have been proposed to vary in efficiency depending on cellular contexts [84]. Accordingly, we found that inhibitors of the Bcl-2 antiapoptotic family, ABT-263 and A-115, were strongly efficient to kill XRA- and Olap-TIS cells but not Enza-TIS cells [31]. The mechanism underlying this latter phenomenon remains unclear but suggests DNA damage is key for sensitization to Bcl-2 family senolytics. However, a recent study also highlights the resistance of Enza-TIS LNCaP to ABT-263, but interestingly reveals that Enza-treated LNCaP cells undergo increased apoptosis upon treatment with an allosteric Akt inhibitor (MK2206) whether or not they were senescent, suggesting this compound blocks an essential survival pathway in these cells [41]. Along the same lines, the senolytic PPL is a compound shown to trigger apoptosis and preferentially kill senescent cells induced by oncogene expression, ionizing radiation or replicative exhaustion [49], but also senescent ovarian cancer cells [31]. Here we show that PPL did not display synergistic or senolytic effect on XRA- or Olap-TIS PCa cells, but had a synergistic effect with short-term Enza treatment, although it did not induce cell death in this context. Our hypothesis is that PPL enhanced the Enza-associated proliferation arrest and therefore only affected residual proliferating cells under short-term treatment. Overall, this supports the idea that the regulation network for TIS-associated apoptosis resistance or survival signals is inducer-dependent in the PCa context and provides multiple targets for pharmacologic interventions.

In addition to being resistant to senolytic concentrations that triggered senolysis in XRA- or Olap-treated cells, long-term Enza-treated LNCaP cells were resistant to higher, non-specific doses of ABT-263 in comparison to untreated cells. These interesting findings require further investigation as they could explain tumor resistance in some clinical settings. These mechanisms of resistance could be due to the acquisition of neuroendocrine features following lineage reprogramming, a well-described phenomenon linked with the acquisition of drug resistance in clinic [86]. This may also be due to autophagy upregulation, a phenomenon already observed in LNCaP cells after AA treatments including Enza and bicalutamide [87], and described as driving the resistance of PCa cells to bicalutamide, Enza, taxanes, mitoxanthrone and radiotherapy [88].

XRA is the most common first-line therapy for PCa, whereas PARPis Olap and rucaparib have now FDA-breakthrough designations for *BRCA1/2*-mutated mCRPC [10]. One study showed that PC-3 cells are characteristic of SCNC, which, although rare and present in 0.5–2% of patients, accounts for 10–20% of PCa found in autopsies of men who died from CRPC [52,89]. Our results, therefore, constitute a solid rationale for further preclinical investigation of a PCa-TIS targeted, one-two punch approach using inhibitors of the Bcl-2 anti-apoptotic protein family. Current limitations of this strategy are risks of navitoclax (ABT-263) inducing thrombocytopenia and neutropenia [90,91] due to Bcl-2 and Bcl-xL inhibition, respectively [58,81]. However, recent studies characterized Bcl-xL inhibitors that target Bcl-xL to specific E3 ligases for degradation in tumor cells but not in platelets, which poorly express this protein [92,93]. The use of such targeted inhibitors could both prevent adverse effects and enhance the proposed PCa-TIS targeting combination therapies at least in the context of DNA damage inducers.

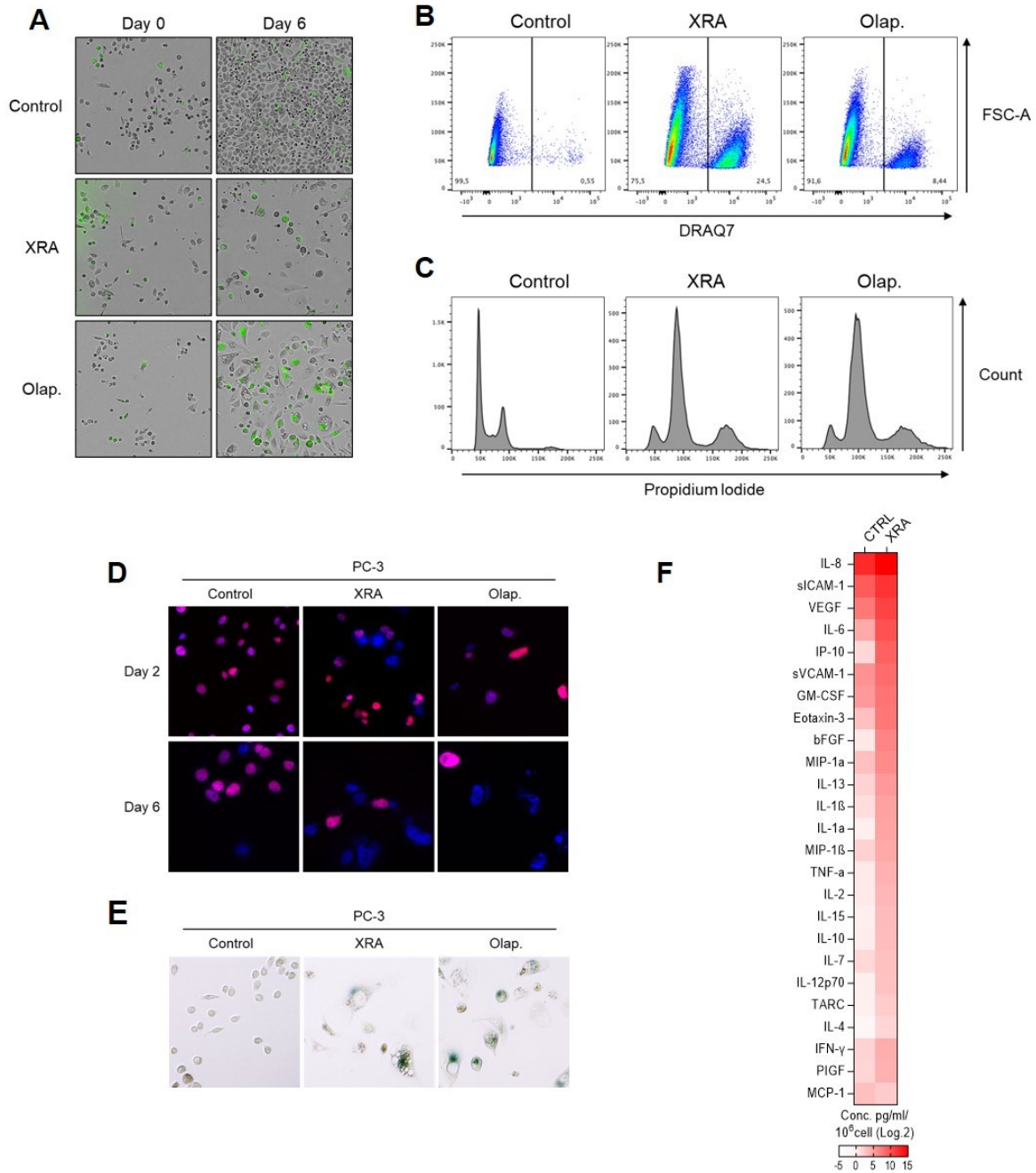
Supplementary Materials

The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1593%20/s1>



Supplementary figure 1

A) Representative images of LNCaP expressing H2B-GFP (green) at 0 or 6 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap. treatment. **B)** The cumulative cell death of LNCaP was analyzed by flow cytometry 6 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap. treatment. **C)** Flow cytometry analysis of cell cycle populations after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap. treatment. **D)** Representative images of LNCaP cells that incorporated EdU for 24 hours at 1 or 5 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap. treatment. The merged red (EdU) and blue (DAPI) channels show colocalization in purple. **E)** Representative images of SA- β -gal assay performed on LNCaP cells 6 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap. treatment. **F)** Levels of secreted cytokines were measured by MSD serum-based multiplex assay 6 days after 8 Gy XRA.

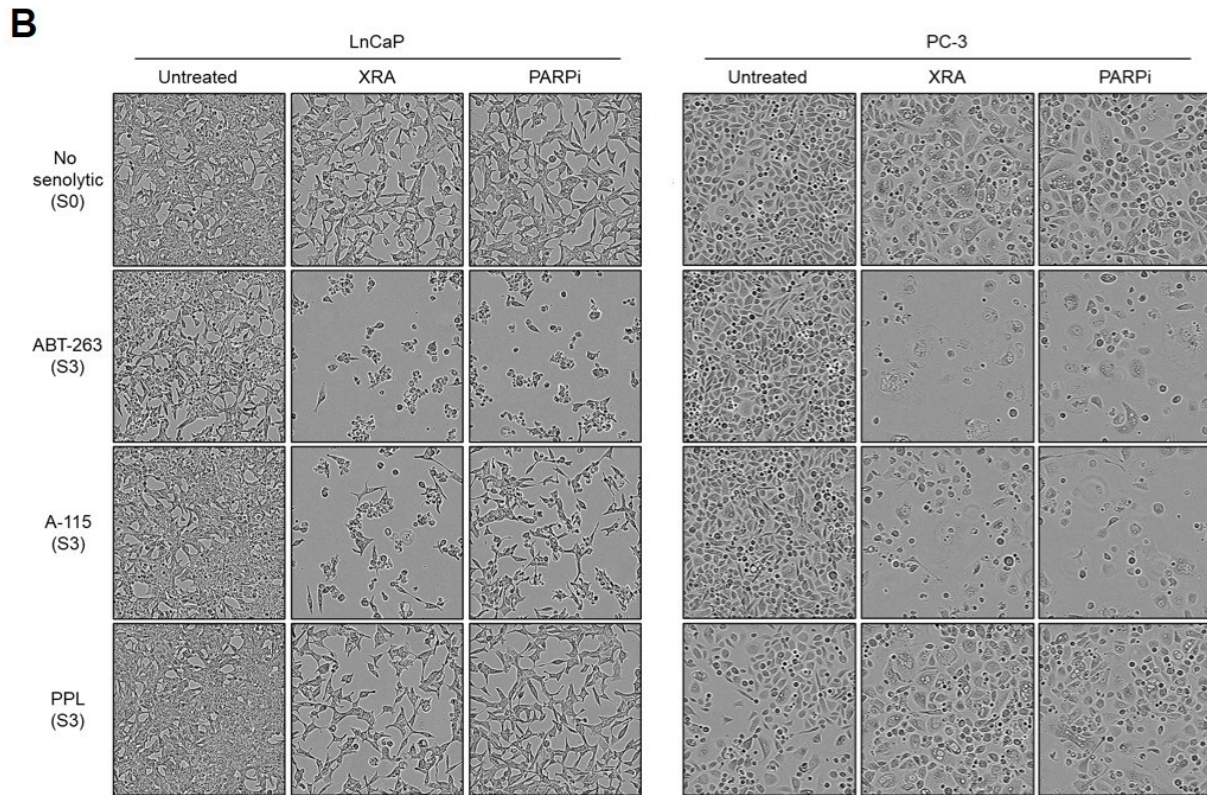


Supplementary figure 2

A) Representative images of PC-3 expressing H2B-GFP (green) 0 or 6 days after 8 Gy of XRA or 5 μ M Olap treatment. **B)** The cumulative cell death of PC-3 was analyzed by flow cytometry 6 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap treatment. **C)** Flow cytometry analysis of cell cycle populations after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap treatment. **D)** Representative images of PC-3 cells that incorporated EdU for 24 hours at 1 or 5 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap treatment. The merged red (EdU) and blue (DAPI) channels show colocalization in purple. **E)** Representative images of SA- β -gal assay performed on PC-3 cells 6 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap treatment. **F)** Levels of secreted cytokines were measured by MSD serum-based multiplex assay 6 days after 8 Gy XRA.

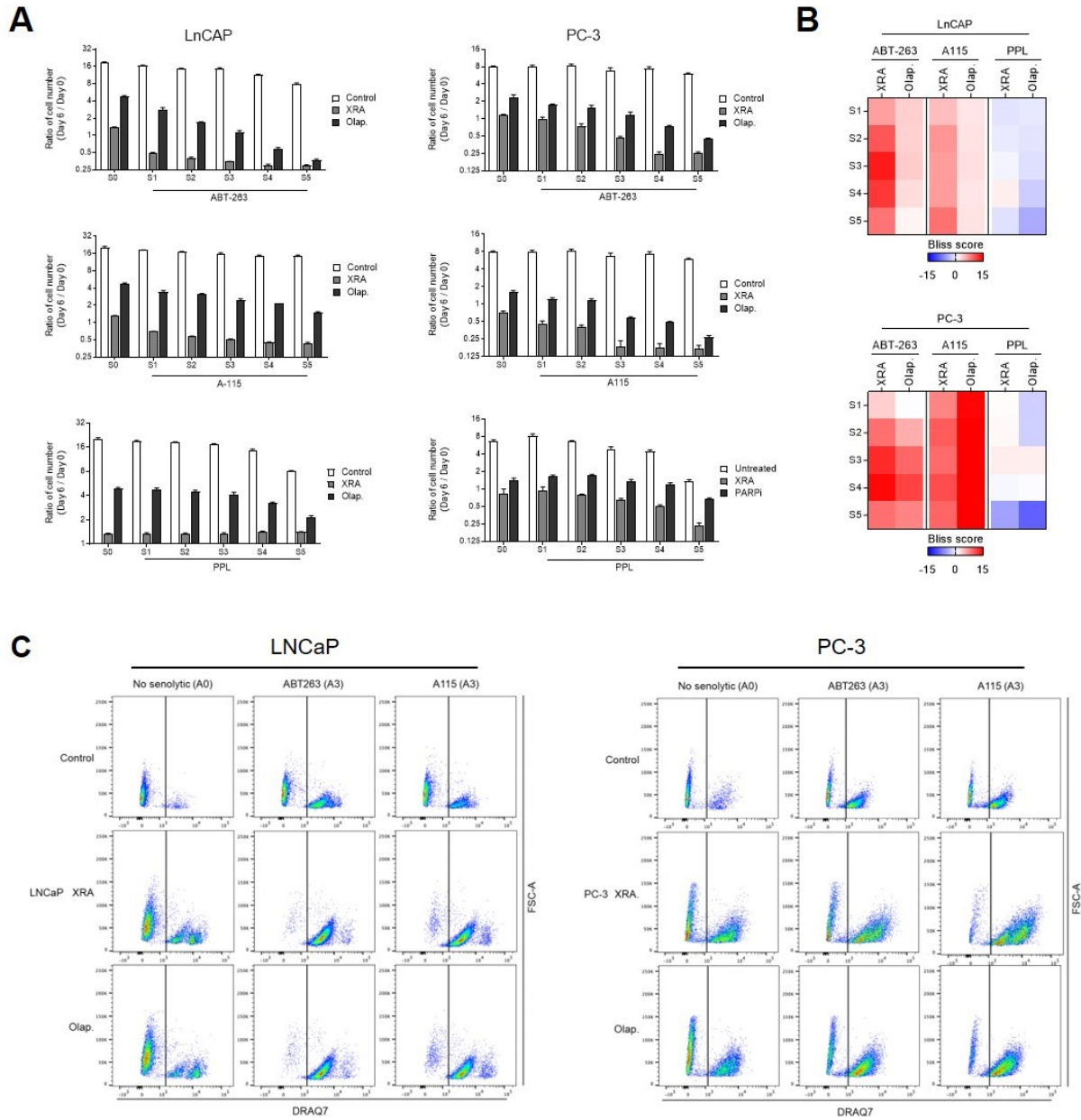
A

		Concentration (μM)		
		ABT-263	A115	PPL
S1		0,3125	0,078125	0,15625
S2		0,625	0,15625	0,3125
S3		1,25	0,3125	0,625
S4		2,5	0,625	1,25
S5		5	1,25	2,5



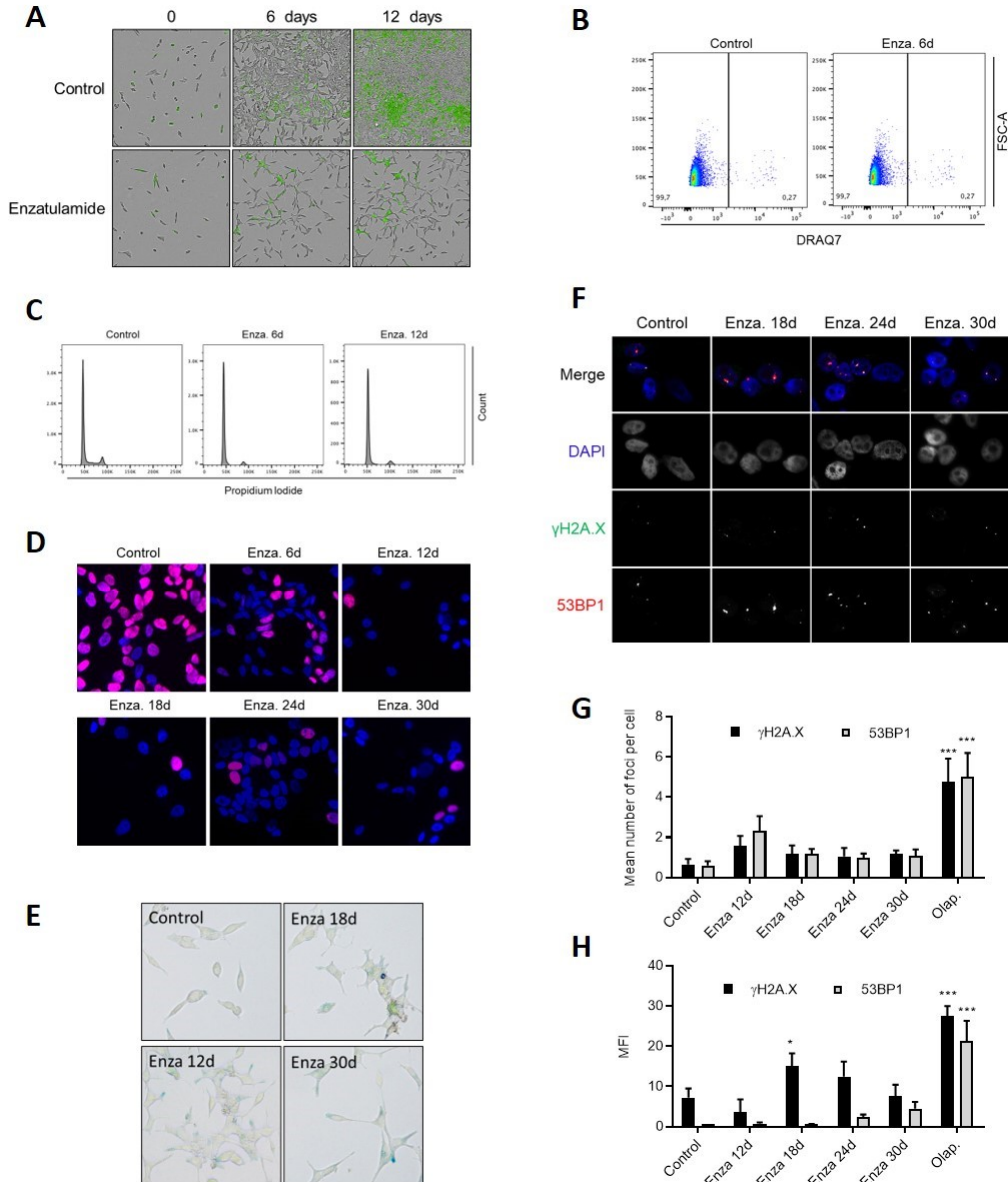
Supplementary figure 3

A) Concentrations of ABT-263, A-115 and PPL that were used in senolysis experiments (Figures 3, 5 and 6). **B)** Representative images of LNCaP (left) and PC-3 (right) that were treated for 6 days with 8 Gy of XRA or 5 μM Olap (PARPi) alone or in combination with 0.625 μM ABT-263 (top), 0.3125 μM A-115 (middle) or 0.625 μM PPL (bottom). For all the data, the mean \pm SD of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tailed Student's t-test.



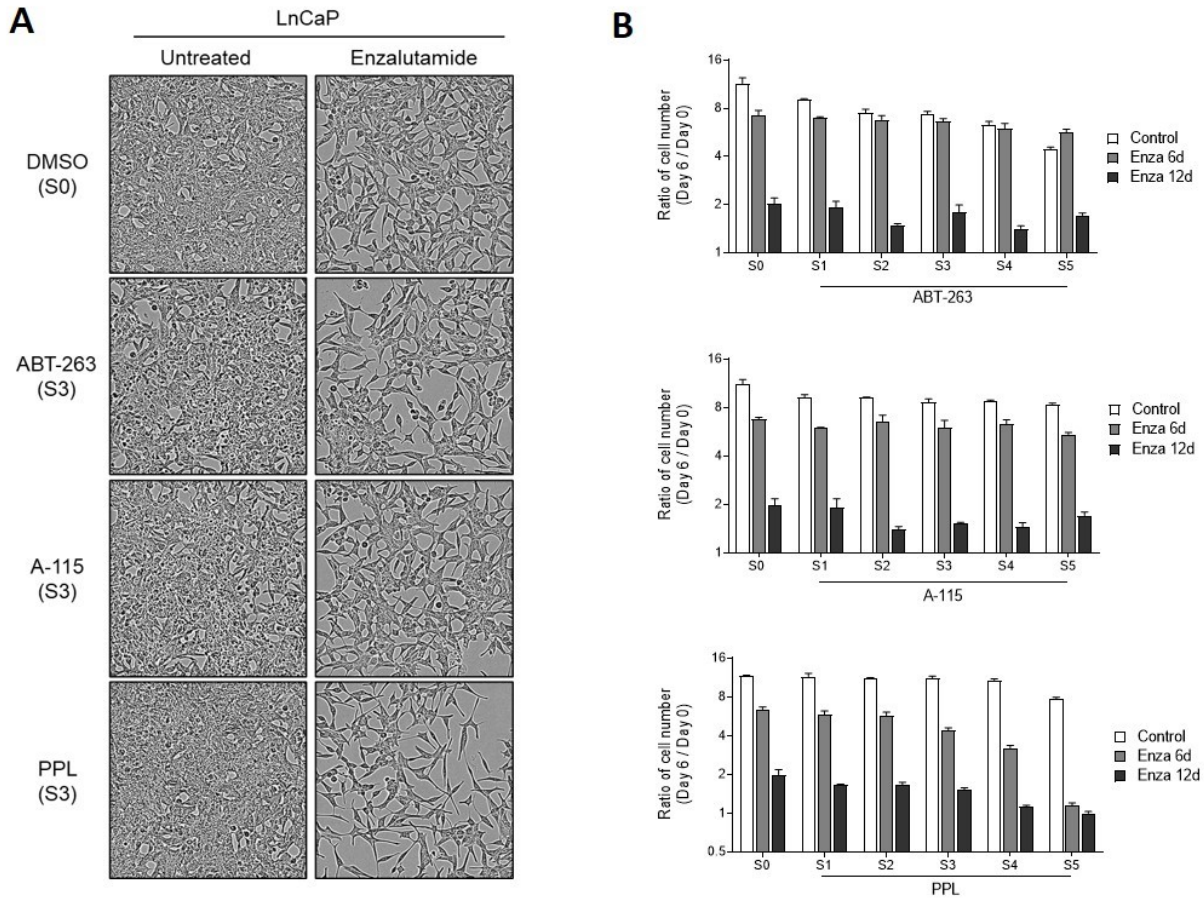
Supplementary figure 4

(A-B) LNCaP or PC-3 expressing H2B-GFP were treated with 8 Gy of XRA or 5 μ M Olap for 6 days, alone or in combination with increasing concentrations of ABT-263, A-115 or PPL. **A)** Cell survival histograms and **B)** Bliss scores heat maps for LNCaP and PC-3 that were exposed to the different combination treatments. S0 to S5 correspond to increasing senolytic concentrations (see Figure S3A). (A) Data are the mean \pm SEM of triplicate and are representatives of three independent experiments. **C)** Flow cytometry analysis of LNCaP (left) or PC-3 (right) cell death 6 days after 8 Gy XRA or 5 μ M Olap treatment alone or in combination with 0.625 μ M ABT-263 or 0.3125 μ M A-115.



Supplementary figure 5

A) Representative images of LNCaP expressing H2B-GFP (green) at 0, 6 or 12 days following 10 μ M Enza treatment. **B)** The cumulative cell death of LNCaP was analyzed by flow cytometry (DRAQ7 staining) 6 days after 10 μ M Enza treatment. **C)** Flow cytometry analysis of cell cycle populations following 6 or 12 days 10 μ M Enza exposure. **D)** Representative images of LNCaP cells that incorporated EdU for 24 hours, 6, 12, 18, 24 or 30 days following 10 μ M Enza exposure. The merged red (EdU) and blue (DAPI) channels show colocalization in purple. **E)** Representative images of SA- β -gal assay performed on LNCaP cells following 12, 18 or 30 days of 10 μ M Enza exposure. **F)** Representative images of γ H2AX (green) and 53BP1 (red) foci per nucleus in LNCaP cells following 6, 12, 18, 24 or 30 days of 10 μ M Enza exposure. The merged red and green channels show colocalization in yellow and DAPI is shown in blue. **(G-H)** Quantification of γ H2AX and 53BP1 foci **G)** number or **H)** mean fluorescence intensity (MFI) per nucleus. Data are the mean \pm SEM of triplicate and are representatives of three independent experiments. Two-way ANOVA. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.



Supplementary figure 6

A) Representative images of LNCaP that were exposed 6 days to 10 μM Enza, alone or in combination with 0.625 μM ABT-263 (top), 0.3125 μM A-115 (middle) or 0.625 μM PPL (bottom). **B)** Cell survival histograms of LNCaP and PC-3 that were treated with 10 μM Enza for 6 or 12 days, alone or in combination with increasing concentrations of ABT-263 (top), A-115 (middle) or PPL (bottom). S0 to S5 correspond to increasing senolytics concentrations (see Figure S3A). Data are the mean \pm SD of triplicate and are representatives of three independent experiments.

Target	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
p15	GAATGCGCGAGGAGAACAAG	CATCATCATGACCTGGATCGC
p16	GGGAGCAGCATGGAGCCT	ATGACCTGGATCGGCCTCCGACCGT
p21	GGGACAGCAGAGGAAGAC	TGGAGTGGTAGAAATCTGTCA
p27	TCCGGCTAACTCTGAGGACA	GTAGAAGAATCGTCGGTTGC
p53	GGAAGACTCCAGTGGTAATCTA	TTGGGCAGTGCTCGCTTA
p57	GCGGTGAGCCAATTTAGAGC	CGGTTGCTGCTACATGAACG
IL-8	GCCAACACAGAAATTATTGTAAAG	TTATGAATTCTCAGCCCTCTTC
IL-6	TGTGTGAAAGCAGCAAAGA	GGCAAGTCTCCTCATTGAA
IL-1 α	ACCAGTGCTGCTGAAGGAGAT	TCTTAGTGCCGTGAGTTTCCC
IL-1 β	AGAAGTACCTGAGCTCGCCA	CTGGAAGGAGCACTTCATCTGT
GM-CSF	CATGTGAATGCCATCCAGGA	CAGGCCACATTCTCTCACTT
IGFBP-2	GCCCTCTGGAGCACCTCTACT	CATCTTGCACTGTTTGAGGTTGTAC

Supplementary Table 1

Forward and reverse primers that were used to detect CDKi and SASP gene transcripts in Q-PCR experiments.

Author Contributions

N.M. and F.R. designed the study. N.M., A.V., S.G., L.A.-H., M.-A.O. and Z.A.A.B. performed experiments. N.M., A.V. and F.R. wrote the manuscript. G.D. and F.S. provided technical support, conceptual advice, and revised the manuscript.

Funding

This research was funded by the Institut du cancer de Montreal-Astellas prostate cancer research fund and by the Cancer Research Society (CRS) (23464).

Acknowledgments

We thank members of the Saad and Rodier/Delouya laboratories for valuable comments and discussions, and Jacqueline Chung for language editing. We thank the Institut du cancer de Montréal (ICM) Imaging and Live imaging platform and the ICM flow cytometry platform. This work was supported by the ICM (FS, GD, FR), by the radiology, radio-oncology and nuclear medicine department of the Université de Montréal (FR, GD) and by the Cancer Research Society (CRS) (23464 to FR). FS, GD and FR are researchers of the CRCHUM/ICM, which receive support from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). FR is supported by a FRQS junior I-II career awards (22624, 33070). NM was supported by an ICM/MITACS postdoctoral fellowship, AV, SG, LAH, MAO and ZA received Canderel fellowships from the ICM, and ZA received a FRQS master award.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Karantanos, T.; Corn, P.G.; Thompson, T.C. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* **2013**, *32*, 5501-5511, doi:10.1038/onc.2013.206.
2. Pollack, A.; Abramowitz, M.C. Weighing the Addition of Androgen Suppression Therapy to Radiotherapy Dose Escalation for Intermediate-Risk Prostate Cancer. *J Clin Oncol* **2016**, *34*, 1715-1717, doi:10.1200/JCO.2015.66.2320.
3. Pilepich, M.V.; Winter, K.; John, M.J.; Mesic, J.B.; Sause, W.; Rubin, P.; Lawton, C.; Machtay, M.; Grignon, D. Phase III radiation therapy oncology group (RTOG) trial 86-10 of androgen deprivation adjuvant to definitive radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2001**, *50*, 1243-1252, doi:10.1016/s0360-3016(01)01579-6.
4. Fizazi, K.; Tran, N.; Fein, L.; Matsubara, N.; Rodriguez-Antolin, A.; Alekseev, B.Y.; Ozguroglu, M.; Ye, D.; Feyereabend, S.; Protheroe, A., et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic,

Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* **2017**, *377*, 352-360, doi:10.1056/NEJMoa1704174.

5. Mateo, J.; Fizazi, K.; Gillessen, S.; Heidenreich, A.; Perez-Lopez, R.; Oyen, W.J.G.; Shore, N.; Smith, M.; Sweeney, C.; Tombal, B., et al. Managing Nonmetastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* **2019**, *75*, 285-293, doi:10.1016/j.eururo.2018.07.035.
6. Scher, H.I.; Fizazi, K.; Saad, F.; Taplin, M.E.; Sternberg, C.N.; Miller, K.; de Wit, R.; Mulders, P.; Chi, K.N.; Shore, N.D., et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* **2012**, *367*, 1187-1197, doi:10.1056/NEJMoa1207506.
7. Ning, Y.M.; Brave, M.; Maher, V.E.; Zhang, L.; Tang, S.; Sridhara, R.; Kim, G.; Ibrahim, A.; Pazdur, R. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Enzalutamide for the Treatment of Patients With Chemotherapy-Naive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncologist* **2015**, *20*, 960-966, doi:10.1634/theoncologist.2015-0166.
8. Hussain, M.; Fizazi, K.; Saad, F.; Rathenborg, P.; Shore, N.; Ferreira, U.; Ivashchenko, P.; Demirhan, E.; Modelska, K.; Phung, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* **2018**, *378*, 2465-2474, doi:10.1056/NEJMoa1800536.
9. Ferraris, D.V. Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic. *J Med Chem* **2010**, *53*, 4561-4584, doi:10.1021/jm100012m.
10. Adashek, J.J.; Jain, R.K.; Zhang, J. Clinical Development of PARP Inhibitors in Treating Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8080860.
11. Ledermann, J.A.; El-Khouly, F. PARP inhibitors in ovarian cancer: Clinical evidence for informed treatment decisions. *Br J Cancer* **2015**, *113 Suppl 1*, S10-16, doi:10.1038/bjc.2015.395.
12. Ledermann, J.; Harter, P.; Gourley, C.; Friedlander, M.; Vergote, I.; Rustin, G.; Scott, C.; Meier, W.; Shapira-Frommer, R.; Safra, T., et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* **2012**, *366*, 1382-1392, doi:10.1056/NEJMoa1105535.

13. Rodier, F.; Munoz, D.P.; Teachenor, R.; Chu, V.; Le, O.; Bhaumik, D.; Coppe, J.P.; Campeau, E.; Beausejour, C.M.; Kim, S.H., et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **2011**, *124*, 68-81, doi:10.1242/jcs.071340.
14. van Deursen, J.M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **2014**, *509*, 439-446, doi:10.1038/nature13193.
15. Nardella, C.; Clohessy, J.G.; Alimonti, A.; Pandolfi, P.P. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 503-511, doi:10.1038/nrc3057.
16. Gonzalez, L.C.; Ghadaouia, S.; Martinez, A.; Rodier, F. Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad? *Biogerontology* **2015**, 10.1007/s10522-015-9593-9, doi:10.1007/s10522-015-9593-9.
17. Malaquin, N.; Martinez, A.; Rodier, F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* **2016**, *82*, 39-49, doi:10.1016/j.exger.2016.05.010.
18. Burton, D.G.; Giribaldi, M.G.; Munoz, A.; Halvorsen, K.; Patel, A.; Jorda, M.; Perez-Stable, C.; Rai, P. Androgen deprivation-induced senescence promotes outgrowth of androgen-refractory prostate cancer cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e68003, doi:10.1371/journal.pone.0068003.
19. Rodier, F.; Coppe, J.P.; Patil, C.K.; Hoeijmakers, W.A.; Munoz, D.P.; Raza, S.R.; Freund, A.; Campeau, E.; Davalos, A.R.; Campisi, J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 973-979, doi:10.1038/ncb1909.
20. Coppe, J.P.; Patil, C.K.; Rodier, F.; Sun, Y.; Munoz, D.P.; Goldstein, J.; Nelson, P.S.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **2008**, *6*, 2853-2868, doi:10.1371/journal.pbio.0060301.

21. Wang, E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* **1995**, *55*, 2284-2292.
22. Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Dai, H.M.; Ling, Y.Y.; Stout, M.B.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Johnson, K.O.; Giles, C.B., et al. Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors. *Aging Cell* **2015**, *10*.1111/accel.12445, doi:10.1111/accel.12445.
23. Yosef, R.; Pilpel, N.; Tokarsky-Amiel, R.; Biran, A.; Ovadya, Y.; Cohen, S.; Vadai, E.; Dassa, L.; Shahar, E.; Condiotti, R., et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11190, doi:10.1038/ncomms11190.
24. Beausejour, C.M.; Krtolica, A.; Galimi, F.; Narita, M.; Lowe, S.W.; Yaswen, P.; Campisi, J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **2003**, *22*, 4212-4222, doi:10.1093/emboj/cdg417.
25. Narita, M.; Nunez, S.; Heard, E.; Narita, M.; Lin, A.W.; Hearn, S.A.; Spector, D.L.; Hannon, G.J.; Lowe, S.W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **2003**, *113*, 703-716.
26. Bhaumik, D.; Scott, G.K.; Schokrpur, S.; Patil, C.K.; Orjalo, A.V.; Rodier, F.; Lithgow, G.J.; Campisi, J. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)* **2009**, *1*, 402-411.
27. Myers, R.B.; Oelschlager, D.K.; Coan, P.N.; Frost, A.R.; Weiss, H.L.; Manne, U.; Pretlow, T.G.; Grizzle, W.E. Changes in cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p27 during the castration induced regression of the CWR22 model of prostatic adenocarcinoma. *J Urol* **1999**, *161*, 945-949.
28. Booth, L.N.; Brunet, A. The Aging Epigenome. *Mol Cell* **2016**, *62*, 728-744, doi:10.1016/j.molcel.2016.05.013.
29. Dorr, J.R.; Yu, Y.; Milanovic, M.; Beuster, G.; Zasada, C.; Dabritz, J.H.; Lisec, J.; Lenze, D.; Gerhardt, A.; Schleicher, K., et al. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **2013**, *501*, 421-425, doi:10.1038/nature12437.

30. Zhang, J.; Chen, L.; Zhang, J.; Wang, Y. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems. *Comput Struct Biotechnol J* **2019**, *17*, 1171-1177, doi:10.1016/j.csbj.2019.07.015.
31. Fleury, H.; Malaquin, N.; Tu, V.; Gilbert, S.; Martinez, A.; Olivier, M.A.; Sauriol, A.; Communal, L.; Leclerc-Desaulniers, K.; Carmona, E., et al. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nat Commun* **2019**, *10*, 2556, doi:10.1038/s41467-019-10460-1.
32. Espiritu, S.M.G.; Liu, L.Y.; Rubanova, Y.; Bhandari, V.; Holgersen, E.M.; Szyca, L.M.; Fox, N.S.; Chua, M.L.K.; Yamaguchi, T.N.; Heisler, L.E., et al. The Evolutionary Landscape of Localized Prostate Cancers Drives Clinical Aggression. *Cell* **2018**, *173*, 1003-1013 e1015, doi:10.1016/j.cell.2018.03.029.
33. Bromfield, G.P.; Meng, A.; Warde, P.; Bristow, R.G. Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **2003**, *6*, 73-85, doi:10.1038/sj.pcan.4500628.
34. Lehmann, B.D.; Paine, M.S.; Brooks, A.M.; McCubrey, J.A.; Renegar, R.H.; Wang, R.; Terrian, D.M. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* **2008**, *68*, 7864-7871, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6538.
35. Ewald, J.; Desotelle, J.; Almassi, N.; Jarrard, D. Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Br J Cancer* **2008**, *98*, 1244-1249, doi:10.1038/sj.bjc.6604288.
36. Toso, A.; Revandkar, A.; Di Mitri, D.; Guccini, I.; Proietti, M.; Sarti, M.; Pinton, S.; Zhang, J.; Kalathur, M.; Civenni, G., et al. Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* **2014**, *9*, 75-89, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.044.
37. Chatterjee, P.; Choudhary, G.S.; Sharma, A.; Singh, K.; Heston, W.D.; Ciezki, J.; Klein, E.A.; Almasan, A. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e60408, doi:10.1371/journal.pone.0060408.

38. Barreto-Andrade, J.C.; Efimova, E.V.; Mauceri, H.J.; Beckett, M.A.; Sutton, H.G.; Darga, T.E.; Vokes, E.E.; Posner, M.C.; Kron, S.J.; Weichselbaum, R.R. Response of human prostate cancer cells and tumors to combining PARP inhibition with ionizing radiation. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 1185-1193, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0061.
39. Faivre, E.J.; Wilcox, D.; Lin, X.; Hessler, P.; Torrent, M.; He, W.; Uziel, T.; Albert, D.H.; McDaniel, K.; Kati, W., et al. Exploitation of Castration-Resistant Prostate Cancer Transcription Factor Dependencies by the Novel BET Inhibitor ABBV-075. *Mol Cancer Res* **2017**, *15*, 35-44, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0221.
40. Ghashghaei, M.; Niazi, T.M.; Heravi, M.; Bekerat, H.; Trifiro, M.; Paliouras, M.; Muanza, T. Enhanced radiosensitization of enzalutamide via schedule dependent administration to androgen-sensitive prostate cancer cells. *Prostate* **2018**, *78*, 64-75, doi:10.1002/pros.23445.
41. Pungsrinont, T.; Sutter, M.F.; Ertingshausen, M.; Lakshmana, G.; Kokal, M.; Khan, A.S.; Baniahmad, A. Senolytic compounds control a distinct fate of androgen receptor agonist- and antagonist-induced cellular senescent LNCaP prostate cancer cells. *Cell Biosci* **2020**, *10*, 59, doi:10.1186/s13578-020-00422-2.
42. Saleh, T.; Tyutyunyk-Massey, L.; Gewirtz, D.A. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res* **2019**, *79*, 1044-1046, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3437.
43. Malaquin, N.; Carrier-Leclerc, A.; Dessureault, M.; Rodier, F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet* **2015**, *6*, 94, doi:10.3389/fgene.2015.00094.
44. Malinowska, K.; Neuwirt, H.; Cavarretta, I.T.; Bektic, J.; Steiner, H.; Dietrich, H.; Moser, P.L.; Fuchs, D.; Hobisch, A.; Culig, Z. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer* **2009**, *16*, 155-169, doi:10.1677/ERC-08-0174.

45. Seaton, A.; Scullin, P.; Maxwell, P.J.; Wilson, C.; Pettigrew, J.; Gallagher, R.; O'Sullivan, J.M.; Johnston, P.G.; Waugh, D.J. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1148-1156, doi:10.1093/carcin/bgn109.
46. Peant, B.; Gilbert, S.; Le Page, C.; Poisson, A.; L'Ecuyer, E.; Boudhraa, Z.; Bienz, M.N.; Delvoye, N.; Saad, F.; Mes-Masson, A.M. IkappaB-Kinase-epsilon (IKKepsilon) over-expression promotes the growth of prostate cancer through the C/EBP-beta dependent activation of IL-6 gene expression. *Oncotarget* **2017**, *8*, 14487-14501, doi:10.18632/oncotarget.11629.
47. Samaraweera, L.; Adomako, A.; Rodriguez-Gabin, A.; McDaid, H.M. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci Rep* **2017**, *7*, 1900, doi:10.1038/s41598-017-01964-1.
48. Wang, C.; Vegna, S.; Jin, H.; Benedict, B.; Lieftink, C.; Ramirez, C.; de Oliveira, R.L.; Morris, B.; Gadiot, J.; Wang, W., et al. Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature* **2019**, *574*, 268-272, doi:10.1038/s41586-019-1607-3.
49. Paez-Ribes, M.; Gonzalez-Gualda, E.; Doherty, G.J.; Munoz-Espin, D. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med* **2019**, *11*, e10234, doi:10.15252/emmm.201810234.
50. Childs, B.G.; Gluscevic, M.; Baker, D.J.; Laberge, R.M.; Marquess, D.; Dananberg, J.; van Deursen, J.M. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 718-735, doi:10.1038/nrd.2017.116.
51. Chang, J.; Wang, Y.; Shao, L.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Campisi, J.; Janakiraman, K.; Sharpless, N.E.; Ding, S.; Feng, W., et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **2016**, *22*, 78-83, doi:10.1038/nm.4010.
52. Tai, S.; Sun, Y.; Squires, J.M.; Zhang, H.; Oh, W.K.; Liang, C.Z.; Huang, J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* **2011**, *71*, 1668-1679, doi:10.1002/pros.21383.

53. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O., et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 9363-9367.
54. Rodier, F. Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Methods Mol Biol* **2013**, *965*, 165-173, doi:10.1007/978-1-62703-239-1_10.
55. Cunningham, D.; You, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* **2015**, *2*, doi:10.14440/jbm.2015.63.
56. Rogakou, E.P.; Pilch, D.R.; Orr, A.H.; Ivanova, V.S.; Bonner, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 5858-5868.
57. Mc Gee, M.M. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm* **2015**, *2015*, 146282, doi:10.1155/2015/146282.
58. Levenson, J.D.; Phillips, D.C.; Mitten, M.J.; Boghaert, E.R.; Diaz, D.; Tahir, S.K.; Belmont, L.D.; Nimmer, P.; Xiao, Y.; Ma, X.M., et al. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci Transl Med* **2015**, *7*, 279ra240, doi:10.1126/scitranslmed.aaa4642.
59. Leslie, S.W.; Soon-Sutton, T.L.; Sajjad, H.; Siref, L.E. Prostate Cancer. In *StatPearls*, Treasure Island (FL), 2020.
60. Higano, C.S.; Beer, T.M.; Taplin, M.E.; Efstathiou, E.; Hirmand, M.; Forer, D.; Scher, H.I. Long-term Safety and Antitumor Activity in the Phase 1-2 Study of Enzalutamide in Pre- and Post-docetaxel Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* **2015**, *68*, 795-801, doi:10.1016/j.eururo.2015.01.026.
61. Litwin, M.S.; Tan, H.J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* **2017**, *317*, 2532-2542, doi:10.1001/jama.2017.7248.
62. Baker, D.J.; Sedivy, J.M. Probing the depths of cellular senescence. *J Cell Biol* **2013**, *202*, 11-13, doi:10.1083/jcb.201305155.

63. De Cecco, M.; Ito, T.; Petrashen, A.P.; Elias, A.E.; Skvir, N.J.; Criscione, S.W.; Caligiana, A.; Broccoli, G.; Adney, E.M.; Boeke, J.D., et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* **2019**, *566*, 73-78, doi:10.1038/s41586-018-0784-9.
64. Goldstein, J.C.; Rodier, F.; Garbe, J.C.; Stampfer, M.R.; Campisi, J. Caspase-independent cytochrome c release is a sensitive measure of low-level apoptosis in cell culture models. *Aging Cell* **2005**, *4*, 217-222, doi:10.1111/j.1474-9726.2005.00163.x.
65. Rodier, F.; Campisi, J.; Bhaumik, D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, 7475-7484, doi:10.1093/nar/gkm744.
66. Simova, J.; Sapega, O.; Imrichova, T.; Stepanek, I.; Kyjacova, L.; Mikyskova, R.; Indrova, M.; Bieblova, J.; Bubenik, J.; Bartek, J., et al. Tumor growth accelerated by chemotherapy-induced senescent cells is suppressed by treatment with IL-12 producing cellular vaccines. *Oncotarget* **2016**, *7*, 54952-54964, doi:10.18632/oncotarget.10712.
67. Pernicova, Z.; Slabakova, E.; Kharraishvili, G.; Bouchal, J.; Kral, M.; Kunicka, Z.; Machala, M.; Kozubik, A.; Soucek, K. Androgen depletion induces senescence in prostate cancer cells through down-regulation of Skp2. *Neoplasia* **2011**, *13*, 526-536, doi:10.1593/neo.11182.
68. Ewald, J.A.; Desotelle, J.A.; Church, D.R.; Yang, B.; Huang, W.; Laurila, T.A.; Jarrard, D.F. Androgen deprivation induces senescence characteristics in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate* **2013**, *73*, 337-345, doi:10.1002/pros.22571.
69. Blute, M.L., Jr.; Damaschke, N.; Wagner, J.; Yang, B.; Gleave, M.; Fazli, L.; Shi, F.; Abel, E.J.; Downs, T.M.; Huang, W., et al. Persistence of senescent prostate cancer cells following prolonged neoadjuvant androgen deprivation therapy. *PLoS One* **2017**, *12*, e0172048, doi:10.1371/journal.pone.0172048.
70. Agus, D.B.; Cordon-Cardo, C.; Fox, W.; Drobnyak, M.; Koff, A.; Golde, D.W.; Scher, H.I. Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. *J Natl Cancer Inst* **1999**, *91*, 1869-1876, doi:10.1093/jnci/91.21.1869.

71. Jividen, K.; Kedzierska, K.Z.; Yang, C.S.; Szlachta, K.; Ratan, A.; Paschal, B.M. Genomic analysis of DNA repair genes and androgen signaling in prostate cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 960, doi:10.1186/s12885-018-4848-x.
72. Bernard, D.; Martinez-Leal, J.F.; Rizzo, S.; Martinez, D.; Hudson, D.; Visakorpi, T.; Peters, G.; Carnero, A.; Beach, D.; Gil, J. CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the Ink4a/Arf locus. *Oncogene* **2005**, *24*, 5543-5551, doi:10.1038/sj.onc.1208735.
73. Seoane, J.; Le, H.V.; Shen, L.; Anderson, S.A.; Massague, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **2004**, *117*, 211-223, doi:10.1016/s0092-8674(04)00298-3.
74. Sweeney, C.J.; Chen, Y.H.; Carducci, M.; Liu, G.; Jarrard, D.F.; Eisenberger, M.; Wong, Y.N.; Hahn, N.; Kohli, M.; Cooney, M.M., et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 737-746, doi:10.1056/NEJMoa1503747.
75. Bourgeois, B.; Madl, T. Regulation of cellular senescence via the FOXO4-p53 axis. *FEBS Lett* **2018**, *592*, 2083-2097, doi:10.1002/1873-3468.13057.
76. Menolfi, D.; Zha, S. ATM, ATR and DNA-PKcs kinases-the lessons from the mouse models: inhibition not equal deletion. *Cell Biosci* **2020**, *10*, 8, doi:10.1186/s13578-020-0376-x.
77. Qiu, X.; Dou, Y. miR-1307 promotes the proliferation of prostate cancer by targeting FOXO3A. *Biomed Pharmacother* **2017**, *88*, 430-435, doi:10.1016/j.biopha.2016.11.120.
78. Zhang, H.; Pan, Y.; Zheng, L.; Choe, C.; Lindgren, B.; Jensen, E.D.; Westendorf, J.J.; Cheng, L.; Huang, H. FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res* **2011**, *71*, 3257-3267, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2603.
79. Shukla, S.; Bhaskaran, N.; Maclennan, G.T.; Gupta, S. Deregulation of FoxO3a accelerates prostate cancer progression in TRAMP mice. *Prostate* **2013**, *73*, 1507-1517, doi:10.1002/pros.22698.

80. Shukla, S.; Shukla, M.; Maclennan, G.T.; Fu, P.; Gupta, S. Deregulation of FOXO3A during prostate cancer progression. *Int J Oncol* **2009**, *34*, 1613-1620, doi:10.3892/ijo_00000291.
81. Debrincat, M.A.; Pleines, I.; Lebois, M.; Lane, R.M.; Holmes, M.L.; Corbin, J.; Vandenberg, C.J.; Alexander, W.S.; Ng, A.P.; Strasser, A., et al. BCL-2 is dispensable for thrombopoiesis and platelet survival. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1721, doi:10.1038/cddis.2015.97.
82. Aliouat-Denis, C.M.; Dendouga, N.; Van den Wyngaert, I.; Goehlmann, H.; Steller, U.; van de Weyer, I.; Van Slycken, N.; Andries, L.; Kass, S.; Luyten, W., et al. p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res* **2005**, *3*, 627-634, doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0121.
83. Demaria, M.; O'Leary, M.N.; Chang, J.; Shao, L.; Liu, S.; Alimirah, F.; Koenig, K.; Le, C.; Mitin, N.; Deal, A.M., et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* **2017**, *7*, 165-176, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
84. Ogrodnik, M.; Miwa, S.; Tchkonja, T.; Tiniakos, D.; Wilson, C.L.; Lahat, A.; Day, C.P.; Burt, A.; Palmer, A.; Anstee, Q.M., et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15691, doi:10.1038/ncomms15691.
85. Li, Y.J.; Lei, Y.H.; Yao, N.; Wang, C.R.; Hu, N.; Ye, W.C.; Zhang, D.M.; Chen, Z.S. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer* **2017**, *36*, 52, doi:10.1186/s40880-017-0219-2.
86. Davies, A.H.; Beltran, H.; Zoubeidi, A. Cellular plasticity and the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **2018**, *15*, 271-286, doi:10.1038/nrurol.2018.22.
87. Nguyen, H.G.; Yang, J.C.; Kung, H.J.; Shi, X.B.; Tilki, D.; Lara, P.N., Jr.; DeVere White, R.W.; Gao, A.C.; Evans, C.P. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene* **2014**, *33*, 4521-4530, doi:10.1038/onc.2014.25.
88. Aguirre-Hernandez, C.; Maya-Pineda, H.; Millan, J.S.; Man, Y.K.S.; Lu, Y.J.; Hallden, G. Sensitisation to mitoxantrone-induced apoptosis by the oncolytic adenovirus Ad through

Bcl-2-dependent attenuation of autophagy. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 6, doi:10.1038/s41389-017-0020-8.

89. Nadal, R.; Schweizer, M.; Kryvenko, O.N.; Epstein, J.I.; Eisenberger, M.A. Small cell carcinoma of the prostate. *Nat Rev Urol* **2014**, *11*, 213-219, doi:10.1038/nrurol.2014.21.
90. Kipps, T.J.; Eradat, H.; Grosicki, S.; Catalano, J.; Cosolo, W.; Dyagil, I.S.; Yalamanchili, S.; Chai, A.; Sahasranaman, S.; Punnoose, E., et al. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **2015**, *56*, 2826-2833, doi:10.3109/10428194.2015.1030638.
91. Cleary, J.M.; Lima, C.M.; Hurwitz, H.I.; Montero, A.J.; Franklin, C.; Yang, J.; Graham, A.; Busman, T.; Mabry, M.; Holen, K., et al. A phase I clinical trial of navitoclax, a targeted high-affinity Bcl-2 family inhibitor, in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* **2014**, *32*, 937-945, doi:10.1007/s10637-014-0110-9.
92. He, Y.; Zhang, X.; Chang, J.; Kim, H.N.; Zhang, P.; Wang, Y.; Khan, S.; Liu, X.; Zhang, X.; Lv, D., et al. Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity. *Nat Commun* **2020**, *11*, 1996, doi:10.1038/s41467-020-15838-0.
93. Khan, S.; Zhang, X.; Lv, D.; Zhang, Q.; He, Y.; Zhang, P.; Liu, X.; Thummuri, D.; Yuan, Y.; Wiegand, J.S., et al. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat Med* **2019**, *25*, 1938-1947, doi:10.1038/s41591-019-0668-z.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Le manuscrit ci-dessus correspond au manuscrit publié par l'éditeur Cells (MDPI), qui a cependant subi un formatage additionnel par l'auteur du mémoire pour les besoins de celui-ci.

Chapitre 4 – Discussion

1) Destins cellulaires provoqués par les traitements induisant des dommages à l'ADN

Les inducteurs de dommages à l'ADN, l'irradiation et l'olaparib, ont déclenché des réponses de SIT typiques dans les cellules du CP, quel que soit leur statut p53, avec des différences notables cependant. Alors que la lignée LNCaP p53 sauvage est principalement entrée en sénescence, la lignée PC-3, déficiente en p53, a suivi un destin cellulaire mixte incluant la CM, la mort cellulaire et la SIT (Fig. 1, 2, S1, S2).

L'entrée en CM des PC-3, qui se matérialise par l'apparition de cellules multi-/micronucléées au contenu 8N (Fig. 2D, 2G, S2C, S2D), pourrait probablement être expliqué par des points de contrôle du cycle cellulaire plus permissifs que ceux des LNCaP, notamment due à leur statut p53. En effet, l'intégrité de ces points de contrôle est un élément déterminant de la sensibilité aux dommages à l'ADN. Par exemple, la combinaison des traitements aux PARPi [47,207-209] ou à l'irradiation [210-212] avec l'inhibition ou la délétion d'ATM, ATR, de CHK1/2, p53 ou de p21 entraîne une forte augmentation de la proportion de cellules multinucléées et de mort cellulaire dans des modèles de cancer colorectal, lymphoïde, de l'ovaire, du poumon et du sein. Dans certains cas, la progression à travers la mitose serait même un processus essentiel à la toxicité des dommages à l'ADN. En effet, une étude a démontré que le contournement de la mitose au profit de l'endoréplication permettait d'abolir la toxicité des PARPi dans des modèles de cancer colorectal et du sein [213]. Bien que p53 soit impliquée dans la transition G2/M [214], elle ne semble pas jouer de rôle important dans le passage à travers la mitose [160,211,215]. En revanche, l'activation de la RDA puis de p53 à la suite de cassures chromosomiques causées lors de la CM sont responsables de l'arrêt du cycle et de l'apoptose induites pendant la phase G1 subséquente. En effet, dans des modèles de cancer du côlon, de l'ovaire et de leucémies, les cellules tumorales p53 sauvages ayant subi une CM à la suite de dommages à l'ADN entrent en apoptose dans la phase G1 subséquentes, alors que les cellules déficientes en p53 subissent plusieurs cycles de réplication de l'ADN et de mitose sans cytokinèse pour devenir multinucléées avant d'encourir

une mort cellulaire caractérisée par un morphotype nécrotique [160,215-218] (voir [chap. 1.4.1](#)). En soutien à ces observations, nos résultats montrent, chez les PC-3 p53-déficientes, le maintien de la synthèse d'ADN 2 jours après irradiation ou inhibition des PARP ainsi que l'apparition de cellules multi-/micronucléées et de cellules mortes (Fig. 2C, 2D, 2G, 2E, S2B, S2C, S2D), ce qui fut observable dans une moindre mesure chez les LNCaP sauvages pour p53 (Fig. 1C, 1D, 1G, 1E). Il serait donc probable que les PC-3 aient subi une mort cellulaire tardive après plusieurs mitoses anormales et que les LNCaP soient mortes plus précocement par un mécanisme d'apoptose p53-dépendant encore fonctionnel, bien que cette hypothèse soit à vérifier à l'aide de technique adaptées (voir [chap. 1.4.1](#)). Ce mécanisme pourrait également expliquer le plus grand nombre de mort cellulaire observé chez les PC-3 que chez les LNCaP (Fig. 2C, 1C).

Globalement, les dommages à l'ADN déclenchés physiquement (irradiation) ou chimiquement (olaparib) ont tous deux induits un robuste arrêt prolifératif après 6 jours dans les lignées du CP, quel que soit leur statut p53 (Fig. 1E, 2E). En accord avec ces résultats, nous avons également observé que ces traitements mènent à l'augmentation du nombre de transcrits des CDKi p15, p16 et p21 chez les LNCaP (Fig. 1H). Cette augmentation fut observée uniquement pour p21 chez les PC-3 (Fig. 2H). Cela pourrait s'expliquer en partie par des niveaux d'expression plus élevés, chez les PC-3, de CBX7, un répresseur du locus p16INK4a/p19ARF, comme déjà observé [219]. D'autre part, alors que la transcription de p21 est habituellement médiée par p53, les PC-3 ont pu réguler à la hausse cette dernière malgré leur statut p53-déficient. La transcription p53-indépendante de p21 a déjà été décrite comme pouvant être médiée par les protéines FOXO [220]. Ces protéines sont impliquées dans la sénescence [221,222] ainsi que dans la croissance et la malignité des CP [223-227] et ont déjà été observées comme positivement régulées après inhibition des PARPs [228]. La kinase Chk2, qui a déjà été décrite comme induisant la sénescence et la transcription de p21 dans les cellules de cancer du sein et de l'ovaire, pourrait également être impliquée [47,228]. La sénescence induite par les dommages à l'ADN des cellules LNCaP et des PC-3 a aussi été caractérisée par un arrêt de croissance G2/M (Fig. 1D, 2D), comme précédemment observé par l'équipe pour les cellules cancéreuses ovariennes déficientes en p53 [47]. Sachant que notre évaluation des proportions de cellules présentes dans chaque phase du cycle est basée sur leur contenu en ADN, il est également possible que les cellules extrapolées comme arrêtées en G2/M

(Fig. 1D, 2D) soient en fait des cellules tétraploïdes arrêtées en phase G1 de manière p21-dépendante, comme fréquemment observé à la suite d'une CM. En effet, sachant que p53 et p21 ne sont pas impliquées dans la prévention de l'entrée en phase M après dommages à l'ADN [160,211,215] et que les LNCaP présentent tout de même une légère proportion de cellules 8N (Fig. 1D), il serait logique de penser que les LNCaP, bien que sauvages pour p53, soient également entrées en CM à la suite des traitements à l'irradiation et à l'olaparib. La différence de proportions en cellules 8N entre les LNCaP et les PC-3 s'expliquerait alors par la présence, chez les LNCaP, de signalisations plus redondantes que celles des PC-3 pour l'apoptose ainsi que pour la transcription/activation des CDKi de la phase G1 comme p21, qui est connue pour prévenir l'apparition de cellules 8N à la suite de dommages à l'ADN (Fig. 1H, 2H) [211,229]. Au-delà du statut p53, d'autres différences génétiques pourraient également expliquer les divergences de destins cellulaires entre les PC-3 et les LNCaP, qui restent des cellules au génome fortement aneuploïdes portant de multiples altérations sur différents gènes liés à la signalisation de la RDA, à la réparation des dommages à l'ADN et aux points de contrôle du cycle cellulaire [120,230]. D'autre part, il serait également intéressant de déterminer, parmi les cellules traitées à l'irradiation ou à l'olaparib, la proportion de cellules étant devenu sénescents à la suite d'une CM, dans le but de déterminer la place et l'importance de ce processus dans l'induction du phénotype sénescents.

2) La sénescence induite par le traitement à l'enzalutamide

La SIT à l'enzalutamide semble plus faible que celle induite par les traitements à l'irradiation ou au PARPi induisant des dommages à l'ADN (Fig. 4, 5, 6). En effet, les cellules traitées à l'enzalutamide n'ont arrêté leur prolifération et leur synthèse d'ADN que progressivement (Fig. 4D, S5D) et leur activité SA β -gal n'a atteint son niveau maximal qu'après 12 jours, un niveau qui reste faible en comparaison à la SIT induite par l'irradiation et le PARPi (Fig. 4E, S5E). De façon frappante, nous avons observé une absence totale de foyers de dommages à l'ADN ou d'instabilité génomique (Fig. 4C, 4F, S5C, S5F-H) lors du traitement à l'enzalutamide. De plus, l'arrêt de croissance déclenché semble avoir lieu en phase G1, ce qui fait contraste avec l'arrêt en G2/M probablement induit par les traitements aux inducteurs de dommages à l'ADN (Fig. 4C, 1D). Certains rapports indiquent une sénescence induite non-pas par inhibition de la signalisation du RA par des AA, mais par la suppression des androgènes du milieu de culture [28,57,181,182].

Contrairement à la SIT à l'enzalutamide, la SIT à la privation androgénique induit des foyers persistants de dommages à l'ADN dans les LNCaP par la production d'espèces réactives d'oxygène [28,57] (Fig. 4F, S5F-H). Cette SIT est également associée à la baisse de la protéolyse de p27^{Kip1} et donc à une augmentation de son activité. Cette protéolyse est habituellement médiée par la E3 ligase Skp2, dont l'activité est stimulée par la signalisation du RA [28]. L'absence de transcriptions de p27^{Kip1} que nous avons observée dans la SIT à l'enzalutamide (Fig. 4G) pourrait donc être expliquée par ce mécanisme de régulation indépendant de la transcription. Les LNCaP affichent également une augmentation de la quantité de transcrits de p15 et de p16, CDKi marqueurs de la sénescence, mais pas de p21, ce qui est cohérent avec une absence de dommages à l'ADN ou d'activation de p53 (Fig. 4G). Bien que l'expression de p16 soit souvent associée à un état irréversible de sénescence [31,33], le traitement à l'enzalutamide pendant plus de 30 jours a induit un arrêt prolifératif réversible après retrait de la molécule du milieu (Fig. 6E). Cela suggère qu'en comparaison à la SIT aux dommages à l'ADN, l'induction et le maintien de la sénescence induite par l'enzalutamide dépend de mécanismes moléculaires différents.

La réversibilité observée de l'arrêt prolifératif pourrait également indiquer le déclenchement d'une simple pause dans le cycle cellulaire due à un manque de signaux de croissance, état communément appelé « quiescence », plutôt que d'un arrêt prolifératif durable lié à un état de sénescence déclenché par un stress [231]. En effet, l'augmentation de l'activité SA β -gal, initialement décrite comme permettant de distinguer les cellules sénescents des cellules quiescentes ou différenciées [39], a déjà été observée chez des cellules dont la quiescence a été induite par la culture en confluence ou en milieu sans sérum [232]. A la différence des cellules sénescents, cette augmentation de l'activité SA β -gal chez les cellules quiescentes était, comme l'arrêt prolifératif, réversible lors du réensemencement de celles-ci en milieu complété en sérum ou en condition de préconfluence [232]. Il est donc possible que l'enzalutamide, dont le mécanisme d'action est d'empêcher les signaux de croissance d'activer le récepteur aux androgènes, mime en partie la condition de déplétion en sérum [125,126]. Les cellules dont la quiescence a été induite par la privation en sérum et les cellules dont la sénescence a été induite par des dommages à l'ADN peuvent être différenciées par l'amplitude de l'augmentation de l'activité SA β -gal, qui est supérieure chez les cellules sénescents [233]. Lors du retrait de

l'enzalutamide du milieu, le délai de reprise de la prolifération fut plus long chez les cellules ayant été préalablement traitées plus longtemps (Fig. 6E), ce qui pourrait être due à une conversion progressive, dans une fraction de plus en plus grande de cellules, de l'arrêt de croissance temporaire lié à un état de quiescence en un arrêt de croissance définitif lié à un état de sénescence. Ce processus, dépendant de la voie mTOR, est appelé géroconversion [234]. La différence entre sénescence et quiescence peut donc également se faire par la comparaison des niveaux d'activité de la voie mTOR, bien plus élevés dans les cellules sénescents [233,234]. Dans le futur, la quantification, dans les cellules traitées à l'enzalutamide, de l'activité mTOR et de l'élargissement morphologique, marqueur mTOR-dépendant de la sénescence cellulaire (voir [chap. 1.1.2.c](#)), pourrait donc nous permettre de distinguer quiescence de sénescence, sachant que le délai plus long de reprise de la prolifération chez les cellules traitées plus longtemps pourrait être également dû à d'autres facteurs comme, par exemple, à une plus grande accumulation intracellulaire d'enzalutamide, qui provoquerait un maintien plus long en quiescence.

Il est cependant important de garder à l'esprit que les phénotypes de SIT dans le contexte du cancer sont à considérer comme des phénotypes « semblables à la sénescence » car la réversibilité de l'arrêt prolifératif associé à la SIT a déjà été observée plusieurs fois dans les cellules cancéreuses traitées aux inducteurs de dommages à l'ADN (voir [chap. 1.4.3.a](#)) [47,170]. De plus, des phénotypes de sénescence réversible et indépendante aux dommages à l'ADN ont déjà été décrits en contexte physiologique. Par exemple, la sénescence programmée lors du développement (voir [chap. 1.1.3.d](#)) est caractérisée par une activité SA β -gal accrue, un PSAS et, bien que dépendante de p21, par une absence de foyers de dommages à l'ADN et par une indépendance à p53. De plus, à l'instar de la SIT à l'enzalutamide, les cellules entrant en sénescence développementale sont capables de retourner dans le cycle cellulaire lors des phases tardive du développement.

3) Manipulation de la sénescence induite par les traitements du cancer de la prostate

Notre équipe, avec d'autres, a proposé et confirmé que la manipulation de la sénescence est une stratégie pertinente d'amélioration du traitement anticancéreux. En effet, cette stratégie « d'enchaînement » visant à induire la sénescence dans les cellules cancéreuses puis à les cibler avec des sénolytiques a connu un succès dans le mélanome, le cancer du sein, des ovaires, du poumon du foie et du pancréas (voir [chap. 1.4.3.b](#)). Ici, nous démontrons que cette stratégie d'enchaînement est également possible dans un modèle d'adénocarcinome métastatique sensible à la castration, les LNCaP, ainsi que dans un modèle de CP à petites cellules, les PC-3. Curieusement, les PC-3 p53-déficientes traitées aux inducteurs de dommages à l'ADN ont présenté une sensibilité aux inhibiteurs de Bcl-2 et de Bcl-xL similaire à celle des LNCaP sauvages pour p53 (Fig. 3, S3, S4). Ceci suggère la présence d'un signal proapoptotique p53-indépendant dans les PC-3 traitées à l'olaparib ou à l'irradiation. En effet, bien qu'il ait été montré que la seule neutralisation des antiapoptotiques de la famille des Bcl-2 puisse être suffisante pour l'induction de l'apoptose [235], les PC-3 non-traitées étaient bien moins sensibles à l'ABT263 et à l'A1155463 que les PC-3 traitées aux inducteurs de dommages à l'ADN (Fig. 3, S3, S5). L'existence d'apoptoses médiées par diverses voies indépendantes de p53 a déjà été extensivement validée chez les LNCaP et les PC-3 traitées avec divers agents dont le docétaxel et des inducteurs de dommages à l'ADN, ce qui soutient nos résultats et met au défi le paradigme décrivant p53 comme le principal inducteur de l'apoptose à la suite du traitement anticancéreux [236-239]. Les résultats de PCR quantitative en temps réel et d'essai multiplex ont montré que les traitements aux inducteurs de dommages à l'ADN menaient à la sécrétion d'un PSAS pro-tumoral par les cellules PC-3 (Fig. 2I, S2F) (voir [chap. 1.1.2.e](#), [chap. 1.1.4.e](#) et [chap. 1.5.2](#)). Les LNCaP traitées aux inducteurs de dommages à l'ADN et à l'enzalutamide ont montré un nombre plus élevé de transcrits d'IL-1 β , composant du PSAS associé aux mauvais pronostiques cliniques des patients et pouvant favoriser la croissance tumorale, l'angiogenèse ou l'apparition de métastases [240] (Fig. 1I, 4G). La cytokine n'a cependant pas été retrouvée dans l'analyse en multiplex des facteurs solubles libérés par les LNCaP traitées par irradiation, qui montre néanmoins une sécrétion de certains facteurs de PSAS déjà décrits comme protumoraux dans le contexte du CP, comme le VEGF, MCP-1 ou l'IL-8 [197-

199,241,242] (Fig. S1F). Ces résultats renforcent encore davantage l'intérêt clinique de l'élimination des cellules prostatiques tumorales sénescents par thérapie combinée.

Il a été proposé que l'efficacité des sénolytiques puisse varier en fonction des types cellulaires concernés et des inducteurs de sénescence employés [186,243]. En effet, nous constatons que les sénolytiques les plus courants, les inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille Bcl-2, ne sont pas efficaces contre la totalité des spectres de SIT dans le CP. Malgré la présence de nombreuses caractéristiques typiques de la sénescence au sein des cellules traitées à l'enzalutamide, celles-ci furent totalement résistantes à l'ABT263 et à l'A1155463, indépendamment de la durée du traitement initial (Fig. 5D, 5B, 6F, S6). Ceci souligne le besoin d'identifier, dans ces cellules, d'autres vulnérabilités pouvant être exploitables dans le cadre d'une stratégie d'enchaînement utilisant des sénolytiques. A l'instar de la nôtre, une récente étude a souligné la résistance à l'ABT-263 des LNCaP traitées à l'enzalutamide, mais a révélé de façon intéressante que celles-ci subissaient une apoptose accrue lors de l'ajout au traitement d'un inhibiteur allostérique d'Akt (MK2206), qui agirait comme un sénolytique dans ce contexte [186]. Il a également été montré que les cellules dont la sénescence a été induite par la privation androgénique exprimaient d'avantage l'antiapoptotique Mcl-1 [57]. Dans le futur, il pourrait donc être intéressant d'évaluer le statut Mcl-1 des cellules traitées à l'enzalutamide, ce qui pourrait éventuellement mener à l'utilisation de l'AZD5991, un inhibiteur de Mcl-1, comme sénolytique dans ce contexte [244]. Nous montrons aussi ici que le PPL, un composé naturel qui tue de manière sélective les cellules sénescents [73], y compris les cellules sénescents du cancer de l'ovaire [47], n'a pas eu d'effet synergique ou sénolytique sur la viabilité des cellules du CP dont la sénescence a été induite par le traitement par irradiation ou olaparib, mais a eu un effet synergique avec le traitement à l'enzalutamide à court terme, sans induire de mort cellulaire (Fig. 3, 5). Notre hypothèse est que le PPL a renforcé l'arrêt prolifératif déclenché par l'enzalutamide et n'a donc affecté que les cellules traitées à court terme dont la prolifération n'était pas encore totalement arrêtée (Fig. 4D). Ce rôle de suppresseur de prolifération avait déjà été décrit dans les cellules de carcinome épidermoïde oral humain [245]. Les cibles du PPL restent néanmoins peu connues et de futures caractérisations plus approfondies sont nécessaires [246].

Nos résultats montrent que les LNCaP traitées au long terme à l'enzalutamide sont également capables de résister aux doses d'ABT263 induisant une cytotoxicité non-spécifique dans les cellules contrôle (Fig. 6F). Ce fut également le cas pour les doses toxiques d'autres sénolytiques (données non-montrées). Ces mécanismes de résistance pourraient être dus à l'acquisition de caractéristiques neuroendocriniennes suite à une transdifférenciation des cellules du CP traitées, un phénomène bien décrit et lié à l'acquisition de résistances aux traitements du CP en clinique [108]. Une des hypothèses que nous formulons est que cette résistance pourrait également être due à une régulation à la hausse de l'autophagie, processus physiologique de dégradation et de recyclage des contenus cytoplasmiques déjà décrit comme impliqué dans la multirésistance aux traitements anticancéreux [247]. La régulation à la hausse de l'autophagie a déjà été observée dans les cellules LNCaP après traitement par AA, notamment par enzalutamide et par bicalutamide [108], et a déjà été décrite comme étant à l'origine de la résistance des cellules du CP au bicalutamide, à l'enzalutamide, aux taxanes, au mitoxantrone et à la radiothérapie [108]. Il a été montré dans plusieurs modèles que le palbociclib, un inhibiteur des kinases CDK 4/6 responsables de l'entrée dans le cycle cellulaire, induisait une sénescence similaire à celle observée chez les LNCaP traitées à l'enzalutamide, caractérisée par une activité SA β -gal accrue et par un arrêt de croissance en G1 réversible [248,249]. Une caractéristique supplémentaire du traitement au palbociclib dans ces modèles était la régulation à la hausse de l'autophagie qui, une fois inhibée par l'utilisation de chloroquine ou de spautine-1, provoquait l'apparition d'un phénotype de sénescence irréversible cette fois. Notre hypothèse est que le fonctionnement de l'enzalutamide est similaire à celui du palbociclib, premièrement pour la ressemblance phénotypique entre les deux sénescences qu'ils induisent, et deuxièmement parce que ces deux inhibiteurs semblent agir sur la même voie moléculaire. En effet, alors que le palbociclib prévient l'entrée en phase G1 en inhibant les CDK 4/6, l'enzalutamide agirait en amont en prévenant le déclenchement de la transcription de la cycline D par la signalisation du RA, ce qui mènerait *in fine* à l'absence d'activation des CDK 4/6 [250,251]. Des résultats préliminaires de notre laboratoire sont disponibles en annexe 1 et suggèrent que le traitement à l'enzalutamide pendant 36 jours, en addition à la chloroquine les 6 derniers jours, provoque des altérations nucléaires chez les

LNCaP observables par fluorescence grâce à l'expression de la protéine chimère H2B-GFP. Une caractérisation plus approfondie de ce phénotype est en cours au laboratoire (voir [chap. 5.2](#)).

Sachant que la radiothérapie est un dispositif utilisé couramment dans les traitements primaires des CP néodiagnostiqués et que l'olaparib et le rucaparib ont obtenu la désignation de « breakthrough therapy » par la FDA (voir [chap. 1.3](#)), nous pourrions imaginer qu'une thérapie combinée incluant des sénolytiques puisse être un jour envisagée en clinique. Plusieurs essais combinant le Navitoclax (ABT263) à des agents anticancéreux précédemment décrits comme induisant la sénescence ont déjà été mis en place. Par exemple, dans le contexte de la leucémie lymphoïde chronique, un essai de phase II impliquant le Navitoclax en combinaison avec le Rituximab, un anticorps monoclonal précédemment décrit comme induisant la sénescence des cellules de lymphomes (voir [chap. 1.4.3](#)), a montré des taux de réponse prometteurs [252]. Des essais similaires de phase I ont également été mis en place chez des patients atteints de diverses tumeurs solides (ovaires, reins, poumons, pancréas, colon, tête et cou, *etc.*), traités au carboplatine/docetaxel, au docetaxel et à la gemcitabine en combinaison au Navitoclax. Cependant, une limite à l'utilisation du Navitoclax fut atteinte de manière récurrente dans ces essais. En effet, l'induction de thrombocytopénies et de neutropénies [252,253] due à l'inhibition de Bcl-2 et de Bcl-xL, respectivement [254,255], a poussé les investigateurs à systématiquement interrompre les études de manière précoce. Il est hautement probable que ces effets « hors-cible » aient limité les doses maximales utilisées chez le patient et ainsi potentiellement limité les bénéfices du traitement. Récemment, une étude a caractérisé un inhibiteur de Bcl-xL nommé DT2216, dont le fonctionnement consiste à diriger Bcl-xL vers la E3 ligase VHL pour induire sa dégradation dans les cellules tumorales mais pas dans les plaquettes sanguines, qui expriment très peu la protéine [256]. Sachant que, dans nos modèles, la seule inhibition de Bcl-xL par l'A1155463 a été aussi efficace que l'inhibition simultanée de Bcl-2 et de Bcl-xL par l'ABT263 (Fig. 3, S3, S4), nous pensons que l'utilisation d'un tel inhibiteur permettrait le développement d'une thérapie d'enchaînement efficace et dépourvue d'effets indésirables liés à des toxicités neutrophiliques ou thrombocytaires. De plus, il est important de souligner que le but premier de ces essais était le ciblage des cellules cancéreuses présentant une haute activité des antiapoptotiques de la famille Bcl-2, hors du contexte plus global de ciblage de la SIT. Il n'est donc

pas certain que les protocoles testés aient induit de la sénescence chez ces patients, ni même que les types de cancer présents dans ces essais aient été représentatifs des modèles précliniques utilisés initialement. L'intégration de la science translationnelle dans ces protocoles d'essai, avec analyse des effets sénolytiques et/ou « sénoinducteurs » sur des biopsies avant et après traitement, ou l'utilisation d'approches d'imagerie des cellules sénescents récemment développées, devrait aider à affiner les stratégies et à les orienter vers les patients les plus susceptibles d'en bénéficier [73]. Ces résultats cliniques démontrent aussi l'importance critique du développement et de l'utilisation de méthodes de criblage à grande-échelle permettant d'identifier de nouvelles molécules à activité sénolytique.

Nous avons utilisé les lignées métastatiques LNCaP et PC-3 comme modèles d'étude pour la caractérisation des destins cellulaires induits par la radiothérapie et par les traitements à l'olaparib et à l'enzalutamide, ainsi que pour l'évaluation des stratégies d'enchaînement impliquant ces traitements en addition à des sénolytiques. Le fait que la lignée des PC-3 ne produise ni ARNm ni protéines du RA ou de l'APS ternie leur réputation auprès de certains chercheurs, qui la qualifient de non-représentative des CP rencontrés en clinique, majoritairement composés d'adénocarcinome exprimant le RA et l'APS [120,257]. Une étude a également démontré que la lignée des PC-3 était caractéristique des carcinomes neuroendocriniens à petites cellules, mais pas des adénocarcinomes [257]. Cependant, bien que les CP à petites cellules soient rares et présents chez 0,5 à 2 % des patients, ils représentent 10 à 20 % des CP retrouvés dans des autopsies d'hommes décédés d'un CPRC [258]. De plus, environ un quart des CPRC comprennent des cellules qui ont subi une reprogrammation cellulaire pour devenir indépendantes du RA et acquérir un continuum de caractéristiques neuroendocriniennes [108]. Sachant que les LNCaP présentent des caractéristiques d'adénocarcinome, sont hormonosensibles et expriment l'APS et le RA [120,257], nous estimons que les modèles cellulaires choisis sont complémentaires et adaptés à l'étude des traitements indiqués dans le CP métastatique, à savoir les traitements à l'enzalutamide et à l'olaparib [127,128,153,154]. Afin de tenter de s'approcher encore d'avantage de la diversité tumorale pouvant être rencontrée en contexte clinique, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences avec des lignées métastatiques hormonorésistantes qui, contrairement aux PC-3, expriment l'APS et le RA, comme

les lignées 22Rv1 ou ARCaP [120]. Bien que la radiothérapie locale soit utilisée dans le traitement du CP métastatique, les bénéfices majeurs qu'elle apporte en contexte clinique sont surtout retrouvés dans le traitement des CP localisés (voir [chap. 1.3.2](#)) [259]. Il serait donc pertinent de vérifier que nos résultats obtenus avec traitement par irradiation puissent être reproduits avec des lignées extraites de tumeurs localisées, comme la lignée CWR22 [121]. D'autre part, évaluer la viabilité des cellules épithéliales prostatiques humaines primaires (ex : HPrEC [11]) traitées ou non aux sénolytiques permettrait d'estimer la spécificité des concentrations utilisées pour les cellules cancéreuses prostatiques. Enfin, l'évaluation préclinique en modèle murin constituera l'étape finale avant évaluation clinique des thérapies d'enchaînement ici proposées. Dans le domaine du CP, les cellules communément utilisées pour la mise en place de xénogreffes murines, à savoir les PC-3, les DU145 et les LNCaP, présentent des limites importantes. En effet, en raison de leur adaptation aux environnements de croissance *in vitro*, ces lignées cellulaires parviennent difficilement à reproduire la structure tridimensionnelle de la tumeur, à reproduire l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale des CP retrouvés en clinique et donc à récapituler avec précision la progression clinique des CP humains et leur réponse à différents traitements [260]. Afin d'obtenir les résultats les plus transférables à l'humain possible, il serait donc pertinent d'utiliser des modèles précliniques de xénogreffes dérivées de patients (XDP), comme les séries LAPC, KUCaP-2 ou LuCaP, qui ont été décrites comme capables de reproduire les principales caractéristiques histopathologiques, génomiques (délétion de PTEN, délétion et mutation de TP53, perte de BRCA2, *etc.*), phénotypiques (transformation, transition vers l'hormonorésistance, *etc.*) et de réponse au traitement des échantillons de CP obtenus de patients [260,261].

Chapitre 5 – Conclusions et perspectives

1) Conclusions

Le but de ce projet a été d'établir un profil systématique des différents destins cellulaires induits par les traitements du CP et d'explorer les possibilités d'intervention pharmacologique pouvant renforcer leur efficacité. Pour cela, nous avons évalué, après traitement des LNCaP et PC-3 par irradiation, olaparib ou enzalutamide, l'apparition de différents marqueurs tels que l'activité SA β -Gal, la synthèse d'ADN, la mort cellulaire, les dommages persistants à l'ADN, l'instabilité génomique et l'expression des gènes des CDKi et du PSAS. En addition à la mort cellulaire et la catastrophe mitotique probablement dépendantes du statut p53, les traitements par irradiation et olaparib ont mené à l'apparition d'un phénotype sénescence classique et convertible en mort cellulaire par des inhibiteurs des antiapoptotiques de la famille de Bcl-2. D'autre part, le traitement de la lignée LNCaP hormonosensible à l'enzalutamide a déclenché un phénotype semblable à la sénescence caractérisé par un arrêt prolifératif réversible, une absence de dommages à l'ADN et une insensibilité à ces mêmes inhibiteurs. De manière intéressante, le PPL, précédemment décrit comme agent sénolytique, a cette fois-ci renforcé l'arrêt prolifératif induit par l'enzalutamide sans promouvoir de mort cellulaire.

2) Perspectives

Bien qu'indispensables à la future mise en place de thérapies d'enchaînement dans un contexte clinique, les données démontrant la présence de SIT dans les tissus prostatiques tumoraux humains sont actuellement trop peu nombreuses, voire inexistantes pour les traitements par PARPi ou radiothérapie externe (voir [chap. 1.5.1](#)). Dans le but de remédier à ce problème, nous avons donc créé une banque de tissus prostatiques provenant de patients nouvellement diagnostiqués et prélevés avant et après traitement par radiothérapie et/ou TPA. En parallèle, ces patients subissent également un prélèvement sanguin qui servira à la mesure quantitative des différents composants systémiques du PSAS. Des micro-étalages de tissus seront générés à partir des biopsies afin de permettre la quantification des biomarqueurs de la RDA et de la sénescence

directement dans le tissu prostatique. Cette quantification sera faite par fluorescence grâce à une technique de normalisation et de quantification hautement reproductible spécialement mise en place par l'équipe. Ces données seront finalement corrélées au destin clinique des patients, ce qui pourra éventuellement poser les bases au développement de nouveaux outils de mesure de l'agressivité des CP néodiagnostiqués en clinique. Parmi les 90 patients visés pour l'étude, 20 sont déjà prélevés et inclus.

Aux vues de l'importance croissante de l'enzalutamide en clinique (voir [chap. 1.3.1.b](#)), il est particulièrement important de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'initiation et au maintien de la SIT à l'enzalutamide dans le but de pouvoir la cibler et/ou de la renforcer pharmacologiquement. Dans ce but, nous mettons actuellement en place, en collaboration avec le Dr Richard Marcotte du Conseil national de recherches Canada, une stratégie non-biaisée de criblage par invalidation génique à grande échelle grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Cette technique est basée sur l'expression d'une nucléase, la Cas9, capable de cliver l'ADN génomique à un locus précis grâce à sa coexpression et à son complexage avec un petit ARN complémentaire à la séquence visée : l'ARN guide. La conséquence de ce clivage est la mise en œuvre, dans la cellule, d'un processus de réparation peu fidèle menant à des décalages de phase et à l'invalidation du gène visé [262]. Notre objectif est de tester une librairie composée de 90 000 ARN guides ciblant environ 18 000 gènes chez les LNCaP afin d'identifier les gènes importants pour le maintien ou l'initiation de la SIT à l'enzalutamide. La pertinence de ce projet est appuyée par le fait que les cellules LNCaP ont déjà été utilisées par d'autres équipes pour des stratégies similaires. Toutefois, nous avons déterminé, lors de séries préliminaires de criblages, que l'expression constitutive de la Cas9 était hautement toxique pour les LNCaP. Nous mettons donc actuellement en place une stratégie utilisant une Cas9 à expression inductible afin de limiter sa toxicité tout en limitant son activité « hors-cible », non-spécifique [262].

En parallèle aux techniques d'investigation à grande échelle, nous approfondissons actuellement l'étude du phénotype induit par le traitement des LNCaP à l'enzalutamide combiné à la chloroquine, une molécule inhibant l'autophagie en empêchant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes [263]. Premièrement, dans le but de savoir si ce phénotype engendre un arrêt de croissance irréversible chez les LNCaP, nous réaliserons des courbes de croissance ainsi que

des marquages à l'EdU de LNCaP traitées par thérapie combinées puis incubées dans un milieu sans enzalutamide ni chloroquine pendant un certain temps. Nous ne savons pas non plus si l'altération morphologique des noyaux observée dans ces cellules est réellement liée à une instabilité génomique. En effet, la fluorescence nucléaire observée sur les images en annexe ne provient pas de l'ADN lui-même, mais d'une protéine de fusion se liant à l'ADN : l'histone H2B-GFP. D'autre part, il est établi que le traitement à la chloroquine induit l'accumulation de lipofuscine dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, un pigment émettant une autofluorescence détectable à 510-530 nm (vert). La lipofuscine, s'accumulant généralement dans les lysosomes et les cytoplasmes des cellules post-mitotiques, pourrait donc potentiellement s'accumuler dans les LNCaP non-prolifératives traitées à l'enzalutamide, ce qui risquerait alors d'induire un signal de fluorescence verte faussement interprétée comme un signal nucléaire [264,265]. Dans le but de savoir si l'altération du signal nucléaire observée dans ces cellules est réellement liée à une instabilité génomique, nous réaliserons donc également des marquages de l'ADN nucléaire au DAPI, détectable à 450-490 nm (bleu), ainsi que des marquages des foyers persistants de dommages à l'ADN chez les LNCaP traitées à l'enzalutamide en combinaison à la chloroquine. Nous comptons également évaluer la sensibilité de ces cellules pour l'ABT263 et l'A1155463, ainsi que pour divers autres sénolytiques ayant déjà fait leur preuve dans la littérature.

Références bibliographiques

1. Hernandez-Segura, A.; Nehme, J.; Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* **2018**, *28*, 436-453, doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001.
2. Hayflick, L.; Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **1961**, *25*, 585-621, doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6.
3. Harley, C.B.; Futcher, A.B.; Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **1990**, *345*, 458-460, doi:10.1038/345458a0.
4. Takai, H.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **2003**, *13*, 1549-1556, doi:10.1016/s0960-9822(03)00542-6.
5. d'Adda di Fagagna, F.; Reaper, P.M.; Clay-Farrace, L.; Fiegler, H.; Carr, P.; Von Zglinicki, T.; Saretzki, G.; Carter, N.P.; Jackson, S.P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **2003**, *426*, 194-198, doi:10.1038/nature02118.
6. Serrano, M.; Lin, A.W.; McCurrach, M.E.; Beach, D.; Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **1997**, *88*, 593-602.
7. Di Leonardo, A.; Linke, S.P.; Clarkin, K.; Wahl, G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **1994**, *8*, 2540-2551.
8. Sedelnikova, O.A.; Horikawa, I.; Zimonjic, D.B.; Popescu, N.C.; Bonner, W.M.; Barrett, J.C. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **2004**, *6*, 168-170, doi:10.1038/ncb1095.

9. Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre, M.; Nuciforo, P.G.; Bensimon, A., et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **2006**, *444*, 638-642, doi:10.1038/nature05327.
10. Collado, M.; Blasco, M.A.; Serrano, M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **2007**, *130*, 223-233, doi:10.1016/j.cell.2007.07.003.
11. Coppe, J.P.; Patil, C.K.; Rodier, F.; Sun, Y.; Munoz, D.P.; Goldstein, J.; Nelson, P.S.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **2008**, *6*, 2853-2868, doi:10.1371/journal.pbio.0060301.
12. Gonzalez, L.C.; Ghadaouia, S.; Martinez, A.; Rodier, F. Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad? *Biogerontology* **2015**, 10.1007/s10522-015-9593-9, doi:10.1007/s10522-015-9593-9.
13. Sun, Y.; Coppe, J.P.; Lam, E.W. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med* **2018**, *24*, 871-885, doi:10.1016/j.molmed.2018.08.002.
14. Baker, D.J.; Wijshake, T.; Tchkonja, T.; LeBrasseur, N.K.; Childs, B.G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J.L.; van Deursen, J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **2011**, *479*, 232-236, doi:10.1038/nature10600.
15. Baker, D.J.; Childs, B.G.; Durik, M.; Wijers, M.E.; Sieben, C.J.; Zhong, J.; Saltness, R.A.; Jeganathan, K.B.; Verzosa, G.C.; Pezeshki, A., et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **2016**, *530*, 184-189, doi:10.1038/nature16932.
16. Krizhanovsky, V.; Yon, M.; Dickins, R.A.; Hearn, S.; Simon, J.; Miething, C.; Yee, H.; Zender, L.; Lowe, S.W. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **2008**, *134*, 657-667, doi:10.1016/j.cell.2008.06.049.

17. Jun, J.I.; Lau, L.F. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging (Albany NY)* **2010**, *2*, 627-631, doi:10.18632/aging.100201.
18. Demaria, M.; Ohtani, N.; Youssef, S.A.; Rodier, F.; Toussaint, W.; Mitchell, J.R.; Laberge, R.M.; Vijg, J.; Van Steeg, H.; Dolle, M.E., et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **2014**, *31*, 722-733, doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012.
19. Storer, M.; Mas, A.; Robert-Moreno, A.; Pecoraro, M.; Ortells, M.C.; Di Giacomo, V.; Yosef, R.; Pilpel, N.; Krizhanovsky, V.; Sharpe, J., et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **2013**, *155*, 1119-1130, doi:10.1016/j.cell.2013.10.041.
20. Munoz-Espin, D.; Canamero, M.; Maraver, A.; Gomez-Lopez, G.; Contreras, J.; Murillo-Cuesta, S.; Rodriguez-Baeza, A.; Varela-Nieto, I.; Ruberte, J.; Collado, M., et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **2013**, *155*, 1104-1118, doi:10.1016/j.cell.2013.10.019.
21. Li, Y.; Zhao, H.; Huang, X.; Tang, J.; Zhang, S.; Li, Y.; Liu, X.; He, L.; Ju, Z.; Lui, K.O., et al. Embryonic senescent cells re-enter cell cycle and contribute to tissues after birth. *Cell Res* **2018**, *28*, 775-778, doi:10.1038/s41422-018-0050-6.
22. Gal, H.; Lysenko, M.; Stroganov, S.; Vadai, E.; Youssef, S.A.; Tzadikvitch-Geffen, K.; Rotkopf, R.; Biron-Shental, T.; de Bruin, A.; Neeman, M., et al. Molecular pathways of senescence regulate placental structure and function. *EMBO J* **2019**, *38*, e100849, doi:10.15252/embj.2018100849.
23. Zhu, Y.; Tchkonina, T.; Pirtskhalava, T.; Gower, A.C.; Ding, H.; Giorgadze, N.; Palmer, A.K.; Ikeno, Y.; Hubbard, G.B.; Lenburg, M., et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* **2015**, *14*, 644-658, doi:10.1111/acel.12344.

24. Chang, J.; Wang, Y.; Shao, L.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Campisi, J.; Janakiraman, K.; Sharpless, N.E.; Ding, S.; Feng, W., et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **2016**, *22*, 78-83, doi:10.1038/nm.4010.
25. Baar, M.P.; Brandt, R.M.C.; Putavet, D.A.; Klein, J.D.D.; Derks, K.W.J.; Bourgeois, B.R.M.; Stryeck, S.; Rijksen, Y.; van Willigenburg, H.; Feijtel, D.A., et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **2017**, *169*, 132-147 e116, doi:10.1016/j.cell.2017.02.031.
26. Lim, S.; Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **2013**, *140*, 3079-3093, doi:10.1242/dev.091744.
27. Calcinotto, A.; Kohli, J.; Zagato, E.; Pellegrini, L.; Demaria, M.; Alimonti, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev* **2019**, *99*, 1047-1078, doi:10.1152/physrev.00020.2018.
28. Pernicova, Z.; Slabakova, E.; Kharaishvili, G.; Bouchal, J.; Kral, M.; Kunicka, Z.; Machala, M.; Kozubik, A.; Soucek, K. Androgen depletion induces senescence in prostate cancer cells through down-regulation of Skp2. *Neoplasia* **2011**, *13*, 526-536, doi:10.1593/neo.11182.
29. Rossi, M.N.; Antonangeli, F. Cellular Response upon Stress: p57 Contribution to the Final Outcome. *Mediators Inflamm* **2015**, *2015*, 259325, doi:10.1155/2015/259325.
30. Ozenne, P.; Eymin, B.; Brambilla, E.; Gazzeri, S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer* **2010**, *127*, 2239-2247, doi:10.1002/ijc.25511.
31. Beausejour, C.M.; Krtolica, A.; Galimi, F.; Narita, M.; Lowe, S.W.; Yaswen, P.; Campisi, J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **2003**, *22*, 4212-4222, doi:10.1093/emboj/cdg417.

32. Dai, C.Y.; Enders, G.H. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* **2000**, *19*, 1613-1622, doi:10.1038/sj.onc.1203438.
33. Narita, M.; Nunez, S.; Heard, E.; Narita, M.; Lin, A.W.; Hearn, S.A.; Spector, D.L.; Hannon, G.J.; Lowe, S.W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **2003**, *113*, 703-716.
34. Thon, J.N.; Devine, M.T.; Jurak Begonja, A.; Tibbitts, J.; Italiano, J.E., Jr. High-content live-cell imaging assay used to establish mechanism of trastuzumab emtansine (T-DM1)--mediated inhibition of platelet production. *Blood* **2012**, *120*, 1975-1984, doi:10.1182/blood-2012-04-420968.
35. Kanda, T.; Sullivan, K.F.; Wahl, G.M. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* **1998**, *8*, 377-385.
36. Salic, A.; Mitchison, T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2415-2420, doi:10.1073/pnas.0712168105.
37. Pozarowski, P.; Darzynkiewicz, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol* **2004**, *281*, 301-311, doi:10.1385/1-59259-811-0:301.
38. Arya, M.; Shergill, I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H.R. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **2005**, *5*, 209-219, doi:10.1586/14737159.5.2.209.
39. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O., et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 9363-9367.

40. Lee, B.Y.; Han, J.A.; Im, J.S.; Morrone, A.; Johung, K.; Goodwin, E.C.; Kleijer, W.J.; DiMaio, D.; Hwang, E.S. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **2006**, *5*, 187-195, doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.
41. Walters, H.E.; Deneka-Hannemann, S.; Cox, L.S. Reversal of phenotypes of cellular senescence by pan-mTOR inhibition. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 231-244, doi:10.18632/aging.100872.
42. Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **2010**, *40*, 179-204, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.019.
43. Panier, S.; Boulton, S.J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 7-18, doi:10.1038/nrm3719.
44. Gupta, A.; Hunt, C.R.; Chakraborty, S.; Pandita, R.K.; Yordy, J.; Ramnarain, D.B.; Horikoshi, N.; Pandita, T.K. Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Radiat Res* **2014**, *181*, 1-8, doi:10.1667/RR13572.1.
45. Gatei, M.; Sloper, K.; Sorensen, C.; Syljuasen, R.; Falck, J.; Hobson, K.; Savage, K.; Lukas, J.; Zhou, B.B.; Bartek, J., et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 14806-14811, doi:10.1074/jbc.M210862200.
46. Sulli, G.; Di Micco, R.; d'Adda di Fagagna, F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 709-720, doi:10.1038/nrc3344.
47. Fleury, H.; Malaquin, N.; Tu, V.; Gilbert, S.; Martinez, A.; Olivier, M.A.; Sauriol, A.; Communal, L.; Leclerc-Desaulniers, K.; Carmona, E., et al. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nat Commun* **2019**, *10*, 2556, doi:10.1038/s41467-019-10460-1.

48. Toledo, L.; Neelsen, K.J.; Lukas, J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol Cell* **2017**, *66*, 735-749, doi:10.1016/j.molcel.2017.05.001.
49. Rodier, F.; Munoz, D.P.; Teachenor, R.; Chu, V.; Le, O.; Bhaumik, D.; Coppe, J.P.; Campeau, E.; Beausejour, C.M.; Kim, S.H., et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **2011**, *124*, 68-81, doi:10.1242/jcs.071340.
50. Herbig, U.; Jobling, W.A.; Chen, B.P.; Chen, D.J.; Sedivy, J.M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **2004**, *14*, 501-513.
51. Rodier, F.; Coppe, J.P.; Patil, C.K.; Hoeijmakers, W.A.; Munoz, D.P.; Raza, S.R.; Freund, A.; Campeau, E.; Davalos, A.R.; Campisi, J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 973-979, doi:10.1038/ncb1909.
52. Faget, D.V.; Ren, Q.; Stewart, S.A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* **2019**, *19*, 439-453, doi:10.1038/s41568-019-0156-2.
53. Rodier, F.; Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **2011**, *192*, 547-556, doi:10.1083/jcb.201009094.
54. Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Dai, H.M.; Ling, Y.Y.; Stout, M.B.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Johnson, K.O.; Giles, C.B., et al. Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors. *Aging Cell* **2015**, 10.1111/accel.12445, doi:10.1111/accel.12445.
55. Wang, E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* **1995**, *55*, 2284-2292.

56. Yosef, R.; Pilpel, N.; Tokarsky-Amiel, R.; Biran, A.; Ovadya, Y.; Cohen, S.; Vadai, E.; Dassa, L.; Shahar, E.; Condiotti, R., et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11190, doi:10.1038/ncomms11190.
57. Burton, D.G.; Giribaldi, M.G.; Munoz, A.; Halvorsen, K.; Patel, A.; Jorda, M.; Perez-Stable, C.; Rai, P. Androgen deprivation-induced senescence promotes outgrowth of androgen-refractory prostate cancer cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e68003, doi:10.1371/journal.pone.0068003.
58. Davalli, P.; Mitic, T.; Caporali, A.; Lauriola, A.; D'Arca, D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 3565127, doi:10.1155/2016/3565127.
59. Bielak-Zmijewska, A.; Mosieniak, G.; Sikora, E. Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mech Ageing Dev* **2018**, *170*, 13-21, doi:10.1016/j.mad.2017.08.004.
60. Lujambio, A. To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *Bioessays* **2016**, *38 Suppl 1*, S56-64, doi:10.1002/bies.201670910.
61. Rayess, H.; Wang, M.B.; Srivatsan, E.S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* **2012**, *130*, 1715-1725, doi:10.1002/ijc.27316.
62. Jafri, M.A.; Ansari, S.A.; Alqahtani, M.H.; Shay, J.W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* **2016**, *8*, 69, doi:10.1186/s13073-016-0324-x.
63. Bodnar, A.G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S.E.; Chiu, C.P.; Morin, G.B.; Harley, C.B.; Shay, J.W.; Lichtsteiner, S.; Wright, W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **1998**, *279*, 349-352, doi:10.1126/science.279.5349.349.

64. Borodkina, A.; Shatrova, A.; Abushik, P.; Nikolsky, N.; Burova, E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY)* **2014**, *6*, 481-495, doi:10.18632/aging.100673.
65. Freund, A.; Patil, C.K.; Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* **2011**, *30*, 1536-1548, doi:10.1038/emboj.2011.69.
66. Barascu, A.; Le Chalony, C.; Pennarun, G.; Genet, D.; Imam, N.; Lopez, B.; Bertrand, P. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* **2012**, *31*, 1080-1094, doi:10.1038/emboj.2011.492.
67. Bartkova, J.; Rezaei, N.; Liontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L.V.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V.C., et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **2006**, *444*, 633-637, doi:10.1038/nature05268.
68. Courtois-Cox, S.; Jones, S.L.; Cichowski, K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* **2008**, *27*, 2801-2809, doi:10.1038/sj.onc.1210950.
69. Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.; Soengas, M.S.; Denoyelle, C.; Kuilman, T.; van der Horst, C.M.; Majoor, D.M.; Shay, J.W.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **2005**, *436*, 720-724, doi:10.1038/nature03890.
70. Young, A.P.; Schlisio, S.; Minamishima, Y.A.; Zhang, Q.; Li, L.; Grisanzio, C.; Signoretti, S.; Kaelin, W.G., Jr. VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* **2008**, *10*, 361-369, doi:10.1038/ncb1699.
71. Pazolli, E.; Alspach, E.; Milczarek, A.; Prior, J.; Piwnica-Worms, D.; Stewart, S.A. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal

fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* **2012**, *72*, 2251-2261, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3386.

72. Liu, H.; Wang, J.; He, T.; Becker, S.; Zhang, G.; Li, D.; Ma, X. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Adv Nutr* **2018**, *9*, 21-29, doi:10.1093/advances/nmx009.
73. Paez-Ribes, M.; Gonzalez-Gualda, E.; Doherty, G.J.; Munoz-Espin, D. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med* **2019**, *11*, e10234, doi:10.15252/emmm.201810234.
74. Cox, L.S.; Redman, C. The role of cellular senescence in ageing of the placenta. *Placenta* **2017**, *52*, 139-145, doi:10.1016/j.placenta.2017.01.116.
75. Chuprin, A.; Gal, H.; Biron-Shental, T.; Biran, A.; Amiel, A.; Rozenblatt, S.; Krizhanovsky, V. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev* **2013**, *27*, 2356-2366, doi:10.1101/gad.227512.113.
76. Bringold, F.; Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* **2000**, *35*, 317-329, doi:10.1016/s0531-5565(00)00083-8.
77. Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* **2017**, *7*, 1016-1036.
78. Ritschka, B.; Storer, M.; Mas, A.; Heinzmann, F.; Ortells, M.C.; Morton, J.P.; Sansom, O.J.; Zender, L.; Keyes, W.M. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev* **2017**, *31*, 172-183, doi:10.1101/gad.290635.116.
79. Chkhotua, A.B.; Gabusi, E.; Altimari, A.; D'Errico, A.; Yakubovich, M.; Vienken, J.; Stefoni, S.; Chieco, P.; Yussim, A.; Grigioni, W.F. Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1)

cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis* **2003**, *41*, 1303-1313, doi:10.1016/s0272-6386(03)00363-9.

80. Melk, A.; Schmidt, B.M.; Takeuchi, O.; Sawitzki, B.; Rayner, D.C.; Halloran, P.F. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* **2004**, *65*, 510-520, doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x.
81. Xu, M.; Palmer, A.K.; Ding, H.; Weivoda, M.M.; Pirtskhalava, T.; White, T.A.; Sepe, A.; Johnson, K.O.; Stout, M.B.; Giorgadze, N., et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife* **2015**, *4*, doi:10.7554/eLife.12997.
82. Ressler, S.; Bartkova, J.; Niederegger, H.; Bartek, J.; Scharffetter-Kochanek, K.; Jansen-Durr, P.; Wlaschek, M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* **2006**, *5*, 379-389, doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x.
83. Liu, Y.; Sanoff, H.K.; Cho, H.; Burd, C.E.; Torrice, C.; Ibrahim, J.G.; Thomas, N.E.; Sharpless, N.E. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* **2009**, *8*, 439-448, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00489.x.
84. Helman, A.; Klochendler, A.; Azazmeh, N.; Gabai, Y.; Horwitz, E.; Anzi, S.; Swisa, A.; Condiotti, R.; Granit, R.Z.; Nevo, Y., et al. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med* **2016**, *22*, 412-420, doi:10.1038/nm.4054.
85. Krishnamurthy, J.; Torrice, C.; Ramsey, M.R.; Kovalev, G.I.; Al-Regaiey, K.; Su, L.; Sharpless, N.E. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* **2004**, *114*, 1299-1307, doi:10.1172/JCI22475.
86. Liang, Y.; Wang, Z. Which is the Most Reasonable Anti-aging Strategy: Meta-analysis. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1086*, 267-282, doi:10.1007/978-981-13-1117-8_17.

87. Schafer, M.J.; White, T.A.; Iijima, K.; Haak, A.J.; Ligresti, G.; Atkinson, E.J.; Oberg, A.L.; Birch, J.; Salmonowicz, H.; Zhu, Y., et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* **2017**, *8*, 14532, doi:10.1038/ncomms14532.
88. Ogrodnik, M.; Miwa, S.; Tchkonja, T.; Tiniakos, D.; Wilson, C.L.; Lahat, A.; Day, C.P.; Burt, A.; Palmer, A.; Anstee, Q.M., et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15691, doi:10.1038/ncomms15691.
89. Bussian, T.J.; Aziz, A.; Meyer, C.F.; Swenson, B.L.; van Deursen, J.M.; Baker, D.J. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **2018**, *562*, 578-582, doi:10.1038/s41586-018-0543-y.
90. Farr, J.N.; Xu, M.; Weivoda, M.M.; Monroe, D.G.; Fraser, D.G.; Onken, J.L.; Negley, B.A.; Sfeir, J.G.; Ogrodnik, M.B.; Hachfeld, C.M., et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med* **2017**, *23*, 1072-1079, doi:10.1038/nm.4385.
91. Herranz, N.; Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* **2018**, *128*, 1238-1246, doi:10.1172/JCI95148.
92. Jeon, O.H.; Kim, C.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Rathod, S.; Vasserot, A.P.; Chung, J.W.; Kim, D.H.; Poon, Y.; David, N., et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* **2017**, *23*, 775-781, doi:10.1038/nm.4324.
93. Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Ling, Y.Y.; Zhao, J.; McGowan, S.J.; Zhu, Y.; Brooks, R.W.; Grassi, D.; Gregg, S.Q.; Stripay, J.L.; Dorransoro, A., et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* **2017**, *8*, 422, doi:10.1038/s41467-017-00314-z.
94. Kang, H.T.; Park, J.T.; Choi, K.; Kim, Y.; Choi, H.J.C.; Jung, C.W.; Lee, Y.S.; Park, S.C. Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat Chem Biol* **2017**, *13*, 616-623, doi:10.1038/nchembio.2342.

95. Zhang, C.; Xie, Y.; Chen, H.; Lv, L.; Yao, J.; Zhang, M.; Xia, K.; Feng, X.; Li, Y.; Liang, X., et al. FOXO4-DRI alleviates age-related testosterone secretion insufficiency by targeting senescent Leydig cells in aged mice. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 1272-1284, doi:10.18632/aging.102682.
96. Malaquin, N.; Martinez, A.; Rodier, F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* **2016**, *82*, 39-49, doi:10.1016/j.exger.2016.05.010.
97. Leslie, S.W.; Soon-Sutton, T.L.; Sajjad, H.; Siref, L.E. Prostate Cancer. In *StatPearls*, Treasure Island (FL), 2020.
98. Gravis, G. Systemic treatment for metastatic prostate cancer. *Asian J Urol* **2019**, *6*, 162-168, doi:10.1016/j.ajur.2019.02.002.
99. Crawford, E.D.; Heidenreich, A.; Lawrentschuk, N.; Tombal, B.; Pompeo, A.C.L.; Mendoza-Valdes, A.; Miller, K.; Debruyne, F.M.J.; Klotz, L. Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **2019**, *22*, 24-38, doi:10.1038/s41391-018-0079-0.
100. Sebesta, E.M.; Anderson, C.B. The Surgical Management of Prostate Cancer. *Semin Oncol* **2017**, *44*, 347-357, doi:10.1053/j.seminoncol.2018.01.003.
101. Damodaran, S.; Kyriakopoulos, C.E.; Jarrard, D.F. Newly Diagnosed Metastatic Prostate Cancer: Has the Paradigm Changed? *Urol Clin North Am* **2017**, *44*, 611-621, doi:10.1016/j.ucl.2017.07.008.
102. Haj-Hamed, M.; Karivedu, V.; Sidana, A. Salvage treatment for radio-recurrent prostate cancer: a review of literature with focus on recent advancements in image-guided focal salvage therapies. *Int Urol Nephrol* **2019**, *51*, 1101-1106, doi:10.1007/s11255-019-02114-4.

103. Karantanos, T.; Corn, P.G.; Thompson, T.C. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* **2013**, *32*, 5501-5511, doi:10.1038/onc.2013.206.
104. Afshar, M.; Evison, F.; James, N.D.; Patel, P. Shifting paradigms in the estimation of survival for castration-resistant prostate cancer: A tertiary academic center experience. *Urol Oncol* **2015**, *33*, 338 e331-337, doi:10.1016/j.urolonc.2015.05.003.
105. Chandrasekar, T.; Yang, J.C.; Gao, A.C.; Evans, C.P. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol* **2015**, *4*, 365-380, doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02.
106. Moreira, D.M.; Howard, L.E.; Sourbeer, K.N.; Amarasekara, H.S.; Chow, L.C.; Cockrell, D.C.; Hanyok, B.T.; Aronson, W.J.; Kane, C.J.; Terris, M.K., et al. Predictors of Time to Metastasis in Castration-resistant Prostate Cancer. *Urology* **2016**, *96*, 171-176, doi:10.1016/j.urology.2016.06.011.
107. Ceder, Y.; Bjartell, A.; Culig, Z.; Rubin, M.A.; Tomlins, S.; Visakorpi, T. The Molecular Evolution of Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol Focus* **2016**, *2*, 506-513, doi:10.1016/j.euf.2016.11.012.
108. Davies, A.H.; Beltran, H.; Zoubeidi, A. Cellular plasticity and the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **2018**, *15*, 271-286, doi:10.1038/nrurol.2018.22.
109. Hussain, M.; Fizazi, K.; Saad, F.; Rathenborg, P.; Shore, N.; Ferreira, U.; Ivashchenko, P.; Demirhan, E.; Moderska, K.; Phung, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* **2018**, *378*, 2465-2474, doi:10.1056/NEJMoa1800536.
110. Nabid, A.; Carrier, N.; Martin, A.G.; Bahary, J.P.; Lemaire, C.; Vass, S.; Bahoric, B.; Archambault, R.; Vincent, F.; Bettahar, R., et al. Duration of Androgen Deprivation Therapy

in High-risk Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial. *Eur Urol* **2018**, *74*, 432-441, doi:10.1016/j.eururo.2018.06.018.

111. Knipper, S.; Karakiewicz, P.I.; Heinze, A.; Preisser, F.; Steuber, T.; Huland, H.; Graefen, M.; Tilki, D. Definition of high-risk prostate cancer impacts oncological outcomes after radical prostatectomy. *Urol Oncol* **2020**, 10.1016/j.urolonc.2019.12.014, doi:10.1016/j.urolonc.2019.12.014.
112. Teo, M.Y.; Rathkopf, D.E.; Kantoff, P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med* **2019**, *70*, 479-499, doi:10.1146/annurev-med-051517-011947.
113. Merriel, S.W.D.; Funston, G.; Hamilton, W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther* **2018**, *35*, 1285-1294, doi:10.1007/s12325-018-0766-1.
114. Braunhut, B.L.; Punnen, S.; Kryvenko, O.N. Updates on Grading and Staging of Prostate Cancer. *Surg Pathol Clin* **2018**, *11*, 759-774, doi:10.1016/j.path.2018.07.003.
115. Jahn, J.L.; Giovannucci, E.L.; Stampfer, M.J. The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *Int J Cancer* **2015**, *137*, 2795-2802, doi:10.1002/ijc.29408.
116. Cooperberg, M.R. Clinical risk-stratification for prostate cancer: Where are we, and where do we need to go? *Can Urol Assoc J* **2017**, *11*, 101-102, doi:10.5489/cuaj.4520.
117. Rodrigues, G.; Warde, P.; Pickles, T.; Crook, J.; Brundage, M.; Souhami, L.; Lukka, H.; Genitourinary Radiation Oncologists of, C. Pre-treatment risk stratification of prostate cancer patients: A critical review. *Can Urol Assoc J* **2012**, *6*, 121-127, doi:10.5489/cuaj.11085.
118. Keyes, M.; Crook, J.; Morton, G.; Vigneault, E.; Usmani, N.; Morris, W.J. Treatment options for localized prostate cancer. *Can Fam Physician* **2013**, *59*, 1269-1274.

119. Sobel, R.E.; Sadar, M.D. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol* **2005**, *173*, 342-359, doi:10.1097/01.ju.0000141580.30910.57.
120. Cunningham, D.; You, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* **2015**, *2*, doi:10.14440/jbm.2015.63.
121. Wainstein, M.A.; He, F.; Robinson, D.; Kung, H.J.; Schwartz, S.; Giaconia, J.M.; Edgehouse, N.L.; Pretlow, T.P.; Bodner, D.R.; Kursh, E.D., et al. CWR22: androgen-dependent xenograft model derived from a primary human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **1994**, *54*, 6049-6052.
122. Chappell, W.H.; Lehmann, B.D.; Terrian, D.M.; Abrams, S.L.; Steelman, L.S.; McCubrey, J.A. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 4579-4588, doi:10.4161/cc.22852.
123. Carroll, A.G.; Voeller, H.J.; Sugars, L.; Gelmann, E.P. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* **1993**, *23*, 123-134, doi:10.1002/pros.2990230206.
124. Kluth, L.A.; Shariat, S.F.; Kratzik, C.; Tagawa, S.; Sonpavde, G.; Rieken, M.; Scherr, D.S.; Pummer, K. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis and prostate cancer: implications for androgen deprivation therapy. *World J Urol* **2014**, *32*, 669-676, doi:10.1007/s00345-013-1157-5.
125. Mateo, J.; Fizazi, K.; Gillessen, S.; Heidenreich, A.; Perez-Lopez, R.; Oyen, W.J.G.; Shore, N.; Smith, M.; Sweeney, C.; Tombal, B., et al. Managing Nonmetastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* **2019**, *75*, 285-293, doi:10.1016/j.eururo.2018.07.035.
126. Higano, C. Enzalutamide, apalutamide, or darolutamide: are apples or bananas best for patients? *Nat Rev Urol* **2019**, *16*, 335-336, doi:10.1038/s41585-019-0186-2.

127. Scher, H.I.; Fizazi, K.; Saad, F.; Taplin, M.E.; Sternberg, C.N.; Miller, K.; de Wit, R.; Mulders, P.; Chi, K.N.; Shore, N.D., et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* **2012**, *367*, 1187-1197, doi:10.1056/NEJMoa1207506.
128. Ning, Y.M.; Brave, M.; Maher, V.E.; Zhang, L.; Tang, S.; Sridhara, R.; Kim, G.; Ibrahim, A.; Pazdur, R. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Enzalutamide for the Treatment of Patients With Chemotherapy-Naive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncologist* **2015**, *20*, 960-966, doi:10.1634/theoncologist.2015-0166.
129. El-Amm, J.; Aragon-Ching, J.B. The Current Landscape of Treatment in Non-Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Med Insights Oncol* **2019**, *13*, 1179554919833927, doi:10.1177/1179554919833927.
130. Li, M.; You, L.; Xue, J.; Lu, Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 522, doi:10.3389/fphar.2018.00522.
131. Skowronek, J. Brachytherapy in the therapy of prostate cancer - an interesting choice. *Contemp Oncol (Pozn)* **2013**, *17*, 407-412, doi:10.5114/wo.2013.38557.
132. Kishan, A.U.; Cook, R.R.; Ciezki, J.P.; Ross, A.E.; Pomerantz, M.M.; Nguyen, P.L.; Shaikh, T.; Tran, P.T.; Sandler, K.A.; Stock, R.G., et al. Radical Prostatectomy, External Beam Radiotherapy, or External Beam Radiotherapy With Brachytherapy Boost and Disease Progression and Mortality in Patients With Gleason Score 9-10 Prostate Cancer. *JAMA* **2018**, *319*, 896-905, doi:10.1001/jama.2018.0587.
133. Thomas, T.S.; Pachynski, R.K. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Mo Med* **2018**, *115*, 156-161.

134. Raval, A.; Dan, T.D.; Williams, N.L.; Pridjian, A.; Den, R.B. Radioisotopes in management of metastatic prostate cancer. *Indian J Urol* **2016**, *32*, 277-281, doi:10.4103/0970-1591.189708.
135. Morse, D.L.; Gray, H.; Payne, C.M.; Gillies, R.J. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 1495-1504, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0130.
136. Fabbri, F.; Amadori, D.; Carloni, S.; Brigliadori, G.; Tesei, A.; Ulivi, P.; Rosetti, M.; Vannini, I.; Arienti, C.; Zoli, W., et al. Mitotic catastrophe and apoptosis induced by docetaxel in hormone-refractory prostate cancer cells. *J Cell Physiol* **2008**, *217*, 494-501, doi:10.1002/jcp.21522.
137. Zhang, F.; Zhang, T.; Qu, Y.; Jiang, T.; Cao, Y.X.; Li, C.; Fan, L.; Mei, Q.B. Replication-dependent gamma-H2AX formation is involved in docetaxel-induced apoptosis in NSCLC A549 cells. *Oncol Rep* **2010**, *24*, 1297-1305, doi:10.3892/or_00000986.
138. Quignon, F.; Rozier, L.; Lachages, A.M.; Bieth, A.; Simili, M.; Debatisse, M. Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene* **2007**, *26*, 165-172, doi:10.1038/sj.onc.1209787.
139. Imreh, G.; Norberg, H.V.; Imreh, S.; Zhivotovsky, B. Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger gammaH2AX-ATM-p53-mediated apoptosis. *J Cell Sci* **2011**, *124*, 2951-2963, doi:10.1242/jcs.081612.
140. Poruchynsky, M.S.; Komlodi-Pasztor, E.; Trostel, S.; Wilkerson, J.; Regairaz, M.; Pommier, Y.; Zhang, X.; Kumar Maity, T.; Robey, R.; Burotto, M., et al. Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 1571-1576, doi:10.1073/pnas.1416418112.

141. Woods, D.; Turchi, J.J. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* **2013**, *14*, 379-389, doi:10.4161/cbt.23761.
142. Corn, P.G.; Heath, E.I.; Zurita, A.; Ramesh, N.; Xiao, L.; Sei, E.; Li-Ning-Tapia, E.; Tu, S.M.; Subudhi, S.K.; Wang, J., et al. Cabazitaxel plus carboplatin for the treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancers: a randomised, open-label, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* **2019**, *20*, 1432-1443, doi:10.1016/S1470-2045(19)30408-5.
143. Capolongo, L.; Belvedere, G.; D'Incalci, M. DNA damage and cytotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin in doxorubicin-sensitive and -resistant human colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **1990**, *25*, 430-434, doi:10.1007/bf00686054.
144. Patel, A.; Fong, L. Immunotherapy for Prostate Cancer: Where Do We Go From Here?-PART 1: Prostate Cancer Vaccines. *Oncology (Williston Park)* **2018**, *32*, 112-120.
145. Helleday, T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* **2011**, *5*, 387-393, doi:10.1016/j.molonc.2011.07.001.
146. Saleh-Gohari, N.; Bryant, H.E.; Schultz, N.; Parker, K.M.; Cassel, T.N.; Helleday, T. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol* **2005**, *25*, 7158-7169, doi:10.1128/MCB.25.16.7158-7169.2005.
147. Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C.J.; Tutt, A.N.; Johnson, D.A.; Richardson, T.B.; Santarosa, M.; Dillon, K.J.; Hickson, I.; Knights, C., et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **2005**, *434*, 917-921, doi:10.1038/nature03445.
148. Strom, C.E.; Johansson, F.; Uhlen, M.; Szigartyo, C.A.; Erixon, K.; Helleday, T. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, 3166-3175, doi:10.1093/nar/gkq1241.

149. Murai, J.; Huang, S.Y.; Das, B.B.; Renaud, A.; Zhang, Y.; Doroshow, J.H.; Ji, J.; Takeda, S.; Pommier, Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* **2012**, *72*, 5588-5599, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
150. Fong, P.C.; Boss, D.S.; Yap, T.A.; Tutt, A.; Wu, P.; Mergui-Roelvink, M.; Mortimer, P.; Swaisland, H.; Lau, A.; O'Connor, M.J., et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* **2009**, *361*, 123-134, doi:10.1056/NEJMoa0900212.
151. Murai, J.; Pommier, Y.J.A.R.o.C.B. PARP trapping beyond homologous recombination and platinum sensitivity in cancers. **2019**, *3*, 131-150.
152. Fleury, H.; Carmona, E.; Morin, V.G.; Meunier, L.; Masson, J.Y.; Tonin, P.N.; Provencher, D.; Mes-Masson, A.M. Cumulative defects in DNA repair pathways drive the PARP inhibitor response in high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40152-40168, doi:10.18632/oncotarget.10308.
153. Mateo, J.; Lord, C.J.; Serra, V.; Tutt, A.; Balmana, J.; Castroviejo-Bermejo, M.; Cruz, C.; Oaknin, A.; Kaye, S.B.; de Bono, J.S. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Ann Oncol* **2019**, *30*, 1437-1447, doi:10.1093/annonc/mdz192.
154. Adashek, J.J.; Jain, R.K.; Zhang, J. Clinical Development of PARP Inhibitors in Treating Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8080860.
155. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 486-541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.

156. Aubrey, B.J.; Kelly, G.L.; Janic, A.; Herold, M.J.; Strasser, A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 104-113, doi:10.1038/cdd.2017.169.
157. Mihara, M.; Erster, S.; Zaika, A.; Petrenko, O.; Chittenden, T.; Pancoska, P.; Moll, U.M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **2003**, *11*, 577-590, doi:10.1016/s1097-2765(03)00050-9.
158. Mery, B.; Guy, J.B.; Vallard, A.; Espenel, S.; Ardail, D.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Rancoule, C.; Magne, N. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death* **2017**, *10*, 1179670717691251, doi:10.1177/1179670717691251.
159. Wlodkowic, D.; Akagi, J.; Dobrucki, J.; Errington, R.; Smith, P.J.; Takeda, K.; Darzynkiewicz, Z. Kinetic viability assays using DRAQ7 probe. *Curr Protoc Cytom* **2013**, *Chapter 9*, Unit 9 41, doi:10.1002/0471142956.cy0941s65.
160. Mc Gee, M.M. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm* **2015**, *2015*, 146282, doi:10.1155/2015/146282.
161. Erenpreisa, J.; Kalejs, M.; Ianzini, F.; Kosmacek, E.A.; Mackey, M.A.; Emzinsh, D.; Cragg, M.S.; Ivanov, A.; Illidge, T.M. Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe. *Cell Biol Int* **2005**, *29*, 1005-1011, doi:10.1016/j.cellbi.2005.10.008.
162. Prieur-Carrillo, G.; Chu, K.; Lindqvist, J.; Dewey, W.C. Computerized video time-lapse (CVTL) analysis of the fate of giant cells produced by X-irradiating EJ30 human bladder carcinoma cells. *Radiat Res* **2003**, *159*, 705-712, doi:10.1667/rr3009.
163. Erenpreisa, J.A.; Cragg, M.S.; Fringes, B.; Sharakhov, I.; Illidge, T.M. Release of mitotic descendants by giant cells from irradiated Burkitt's lymphoma cell line. *Cell Biol Int* **2000**, *24*, 635-648, doi:10.1006/cbir.2000.0558.

164. Vakifahmetoglu, H.; Olsson, M.; Zhivotovsky, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 1153-1162, doi:10.1038/cdd.2008.47.
165. Demaria, M.; O'Leary, M.N.; Chang, J.; Shao, L.; Liu, S.; Alimirah, F.; Koenig, K.; Le, C.; Mitin, N.; Deal, A.M., et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* **2017**, *7*, 165-176, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
166. Song, Y.; Baba, T.; Mukaida, N. Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *477*, 515-519, doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.063.
167. Roberson, R.S.; Kussick, S.J.; Vallieres, E.; Chen, S.Y.; Wu, D.Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* **2005**, *65*, 2795-2803, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1270.
168. Kubo, N.; Noda, S.E.; Takahashi, A.; Yoshida, Y.; Oike, T.; Murata, K.; Musha, A.; Suzuki, Y.; Ohno, T.; Takahashi, T., et al. Radiosensitizing effect of carboplatin and paclitaxel to carbon-ion beam irradiation in the non-small-cell lung cancer cell line H460. *J Radiat Res* **2015**, *56*, 229-238, doi:10.1093/jrr/rru085.
169. Dabritz, J.H.; Yu, Y.; Milanovic, M.; Schonlein, M.; Rosenfeldt, M.T.; Dorr, J.R.; Kaufmann, A.M.; Dorken, B.; Schmitt, C.A. CD20-Targeting Immunotherapy Promotes Cellular Senescence in B-Cell Lymphoma. *Mol Cancer Ther* **2016**, *15*, 1074-1081, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0627.
170. Saleh, T.; Tyutyunyk-Massey, L.; Gewirtz, D.A. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res* **2019**, *79*, 1044-1046, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3437.

171. Modrak, D.E.; Leon, E.; Goldenberg, D.M.; Gold, D.V. Ceramide regulates gemcitabine-induced senescence and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Mol Cancer Res* **2009**, *7*, 890-896, doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0457.
172. Samaraweera, L.; Adomako, A.; Rodriguez-Gabin, A.; McDaid, H.M. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci Rep* **2017**, *7*, 1900, doi:10.1038/s41598-017-01964-1.
173. Wang, L.; Leite de Oliveira, R.; Wang, C.; Fernandes Neto, J.M.; Mainardi, S.; Evers, B.; Liefstink, C.; Morris, B.; Jochems, F.; Willemsen, L., et al. High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep* **2017**, *21*, 773-783, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.085.
174. Wang, C.; Vegna, S.; Jin, H.; Benedict, B.; Liefstink, C.; Ramirez, C.; de Oliveira, R.L.; Morris, B.; Gadiot, J.; Wang, W., et al. Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature* **2019**, *574*, 268-272, doi:10.1038/s41586-019-1607-3.
175. Chen, Z.; Trotman, L.C.; Shaffer, D.; Lin, H.K.; Dotan, Z.A.; Niki, M.; Koutcher, J.A.; Scher, H.I.; Ludwig, T.; Gerald, W., et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **2005**, *436*, 725-730, doi:10.1038/nature03918.
176. Barreto-Andrade, J.C.; Efimova, E.V.; Mauceri, H.J.; Beckett, M.A.; Sutton, H.G.; Darga, T.E.; Vokes, E.E.; Posner, M.C.; Kron, S.J.; Weichselbaum, R.R. Response of human prostate cancer cells and tumors to combining PARP inhibition with ionizing radiation. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 1185-1193, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0061.
177. Chatterjee, P.; Choudhary, G.S.; Sharma, A.; Singh, K.; Heston, W.D.; Ciezki, J.; Klein, E.A.; Almasan, A. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e60408, doi:10.1371/journal.pone.0060408.

178. Bromfield, G.P.; Meng, A.; Warde, P.; Bristow, R.G. Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **2003**, *6*, 73-85, doi:10.1038/sj.pcan.4500628.
179. Lehmann, B.D.; Paine, M.S.; Brooks, A.M.; McCubrey, J.A.; Renegar, R.H.; Wang, R.; Terrian, D.M. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* **2008**, *68*, 7864-7871, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6538.
180. Rakozy, C.; Grignon, D.J.; Sarkar, F.H.; Sakr, W.A.; Littrup, P.; Forman, J. Expression of bcl-2, p53, and p21 in benign and malignant prostatic tissue before and after radiation therapy. *Mod Pathol* **1998**, *11*, 892-899.
181. Ewald, J.A.; Desotelle, J.A.; Church, D.R.; Yang, B.; Huang, W.; Laurila, T.A.; Jarrard, D.F. Androgen deprivation induces senescence characteristics in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate* **2013**, *73*, 337-345, doi:10.1002/pros.22571.
182. Blute, M.L., Jr.; Damaschke, N.; Wagner, J.; Yang, B.; Gleave, M.; Fazli, L.; Shi, F.; Abel, E.J.; Downs, T.M.; Huang, W., et al. Persistence of senescent prostate cancer cells following prolonged neoadjuvant androgen deprivation therapy. *PLoS One* **2017**, *12*, e0172048, doi:10.1371/journal.pone.0172048.
183. Agus, D.B.; Cordon-Cardo, C.; Fox, W.; Drobnjak, M.; Koff, A.; Golde, D.W.; Scher, H.I. Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. *J Natl Cancer Inst* **1999**, *91*, 1869-1876, doi:10.1093/jnci/91.21.1869.
184. Faivre, E.J.; Wilcox, D.; Lin, X.; Hessler, P.; Torrent, M.; He, W.; Uziel, T.; Albert, D.H.; McDaniel, K.; Kati, W., et al. Exploitation of Castration-Resistant Prostate Cancer Transcription Factor Dependencies by the Novel BET Inhibitor ABBV-075. *Mol Cancer Res* **2017**, *15*, 35-44, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0221.

185. Ghashghaei, M.; Niazi, T.M.; Heravi, M.; Bekerat, H.; Trifiro, M.; Paliouras, M.; Muanza, T. Enhanced radiosensitization of enzalutamide via schedule dependent administration to androgen-sensitive prostate cancer cells. *Prostate* **2018**, *78*, 64-75, doi:10.1002/pros.23445.
186. Pungsrinont, T.; Sutter, M.F.; Ertingshausen, M.; Lakshmana, G.; Kokal, M.; Khan, A.S.; Baniahmad, A. Senolytic compounds control a distinct fate of androgen receptor agonist- and antagonist-induced cellular senescent LNCaP prostate cancer cells. *Cell Biosci* **2020**, *10*, 59, doi:10.1186/s13578-020-00422-2.
187. Roediger, J.; Hessenkemper, W.; Bartsch, S.; Manvelyan, M.; Huettner, S.S.; Liehr, T.; Esmaeili, M.; Foller, S.; Petersen, I.; Grimm, M.O., et al. Supraphysiological androgen levels induce cellular senescence in human prostate cancer cells through the Src-Akt pathway. *Mol Cancer* **2014**, *13*, 214, doi:10.1186/1476-4598-13-214.
188. Chatterjee, P.; Schweizer, M.T.; Lucas, J.M.; Coleman, I.; Nyquist, M.D.; Frank, S.B.; Tharakan, R.; Mostaghel, E.; Luo, J.; Pritchard, C.C., et al. Supraphysiological androgens suppress prostate cancer growth through androgen receptor-mediated DNA damage. *J Clin Invest* **2019**, *130*, 4245-4260, doi:10.1172/JCI127613.
189. Gravina, G.L.; Marampon, F.; Sanita, P.; Festuccia, C.; Forcella, C.; Scarsella, L.; Jitariuc, A.; Vetuschi, A.; Sferra, R.; Colapietro, A., et al. Episode-like pulse testosterone supplementation induces tumor senescence and growth arrest down-modulating androgen receptor through modulation of p-ERK1/2, pAR(ser81) and CDK1 signaling: biological implications for men treated with testosterone replacement therapy. *Oncotarget* **2017**, *8*, 113792-113806, doi:10.18632/oncotarget.22776.
190. Mirochnik, Y.; Veliceasa, D.; Williams, L.; Maxwell, K.; Yemelyanov, A.; Budunova, I.; Volpert, O.V. Androgen receptor drives cellular senescence. *PLoS One* **2012**, *7*, e31052, doi:10.1371/journal.pone.0031052.

191. Lam, H.M.; Corey, E. Supraphysiological Testosterone Therapy as Treatment for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol* **2018**, *8*, 167, doi:10.3389/fonc.2018.00167.
192. Ewald, J.; Desotelle, J.; Almassi, N.; Jarrard, D. Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Br J Cancer* **2008**, *98*, 1244-1249, doi:10.1038/sj.bjc.6604288.
193. Toso, A.; Revandkar, A.; Di Mitri, D.; Guccini, I.; Proietti, M.; Sarti, M.; Pinton, S.; Zhang, J.; Kalathur, M.; Civenni, G., et al. Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* **2014**, *9*, 75-89, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.044.
194. Simova, J.; Sapega, O.; Imrichova, T.; Stepanek, I.; Kyjacova, L.; Mikyskova, R.; Indrova, M.; Bieblova, J.; Bubenik, J.; Bartek, J., et al. Tumor growth accelerated by chemotherapy-induced senescent cells is suppressed by treatment with IL-12 producing cellular vaccines. *Oncotarget* **2016**, *7*, 54952-54964, doi:10.18632/oncotarget.10712.
195. Culig, Z.; Puhf, M. Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions. *Mol Cell Endocrinol* **2018**, *462*, 25-30, doi:10.1016/j.mce.2017.03.012.
196. Degraff, D.J.; Aguiar, A.A.; Sikes, R.A. Disease evidence for IGFBP-2 as a key player in prostate cancer progression and development of osteosclerotic lesions. *Am J Transl Res* **2009**, *1*, 115-130.
197. Seaton, A.; Scullin, P.; Maxwell, P.J.; Wilson, C.; Pettigrew, J.; Gallagher, R.; O'Sullivan, J.M.; Johnston, P.G.; Waugh, D.J. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1148-1156, doi:10.1093/carcin/bgn109.

198. Singh, R.K.; Lokeshwar, B.L. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer Res* **2011**, *71*, 3268-3277, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2769.
199. Neveu, B.; Moreel, X.; Deschenes-Romppe, M.P.; Bergeron, A.; LaRue, H.; Ayari, C.; Fradet, Y.; Fradet, V. IL-8 secretion in primary cultures of prostate cells is associated with prostate cancer aggressiveness. *Res Rep Urol* **2014**, *6*, 27-34, doi:10.2147/RRU.S58643.
200. Taddei, M.L.; Cavallini, L.; Comito, G.; Giannoni, E.; Folini, M.; Marini, A.; Gandellini, P.; Morandi, A.; Pintus, G.; Raspollini, M.R., et al. Senescent stroma promotes prostate cancer progression: the role of miR-210. *Mol Oncol* **2014**, *8*, 1729-1746, doi:10.1016/j.molonc.2014.07.009.
201. Sun, Y.; Campisi, J.; Higano, C.; Beer, T.M.; Porter, P.; Coleman, I.; True, L.; Nelson, P.S. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* **2012**, *18*, 1359-1368, doi:10.1038/nm.2890.
202. Hessvik, N.P.; Sandvig, K.; Llorente, A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet* **2013**, *4*, 36, doi:10.3389/fgene.2013.00036.
203. Alessio, N.; Aprile, D.; Squillaro, T.; Di Bernardo, G.; Finicelli, M.; Melone, M.A.; Peluso, G.; Galderisi, U. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) from mesenchymal stromal cells impairs growth of immortalized prostate cells but has no effect on metastatic prostatic cancer cells. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 5817-5828, doi:10.18632/aging.102172.
204. Castro, P.; Giri, D.; Lamb, D.; Ittmann, M. Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **2003**, *55*, 30-38, doi:10.1002/pros.10204.
205. Vital, P.; Castro, P.; Tsang, S.; Ittmann, M. The senescence-associated secretory phenotype promotes benign prostatic hyperplasia. *Am J Pathol* **2014**, *184*, 721-731, doi:10.1016/j.ajpath.2013.11.015.

206. Jiang, S.; Song, C.S.; Chatterjee, B. Stimulation of Prostate Cells by the Senescence Phenotype of Epithelial and Stromal Cells: Implication for Benign Prostate Hyperplasia. *FASEB Bioadv* **2019**, *1*, 353-363, doi:10.1096/fba.2018-00084.
207. Mani, C.; Jonnalagadda, S.; Lingareddy, J.; Awasthi, S.; Gmeiner, W.H.; Palle, K. Prexasertib treatment induces homologous recombination deficiency and synergizes with olaparib in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **2019**, *21*, 104, doi:10.1186/s13058-019-1192-2.
208. Kim, H.; George, E.; Ragland, R.; Rafail, S.; Zhang, R.; Krepler, C.; Morgan, M.; Herlyn, M.; Brown, E.; Simpkins, F. Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin Cancer Res* **2017**, *23*, 3097-3108, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2273.
209. Weston, V.J.; Oldreive, C.E.; Skowronska, A.; Oscier, D.G.; Pratt, G.; Dyer, M.J.; Smith, G.; Powell, J.E.; Rudzki, Z.; Kearns, P., et al. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* **2010**, *116*, 4578-4587, doi:10.1182/blood-2010-01-265769.
210. Wang, Q.; Fan, S.; Eastman, A.; Worland, P.J.; Sausville, E.A.; O'Connor, P.M. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst* **1996**, *88*, 956-965, doi:10.1093/jnci/88.14.956.
211. Andreassen, P.R.; Lacroix, F.B.; Lohez, O.D.; Margolis, R.L. Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells. *Cancer Res* **2001**, *61*, 7660-7668.
212. On, K.F.; Chen, Y.; Ma, H.T.; Chow, J.P.; Poon, R.Y. Determinants of mitotic catastrophe on abrogation of the G2 DNA damage checkpoint by UCN-01. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 784-794, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0809.

213. Schoonen, P.M.; Talens, F.; Stok, C.; Gogola, E.; Heijink, A.M.; Bouwman, P.; Foijer, F.; Tarsounas, M.; Blatter, S.; Jonkers, J., et al. Progression through mitosis promotes PARP inhibitor-induced cytotoxicity in homologous recombination-deficient cancer cells. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15981, doi:10.1038/ncomms15981.
214. Taylor, W.R.; Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **2001**, *20*, 1803-1815, doi:10.1038/sj.onc.1204252.
215. Imreh, G.; Norberg, H.V.; Imreh, S.; Zhivotovsky, B. Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger gammaH2AX-ATM-p53-mediated apoptosis. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 1950, doi:10.1242/jcs.190132.
216. Vakifahmetoglu, H.; Olsson, M.; Tamm, C.; Heidari, N.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 555-566, doi:10.1038/sj.cdd.4402286.
217. Dale Rein, I.; Solberg Landsverk, K.; Micci, F.; Patzke, S.; Stokke, T. Replication-induced DNA damage after PARP inhibition causes G2 delay, and cell line-dependent apoptosis, necrosis and multinucleation. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 3248-3260, doi:10.1080/15384101.2015.1085137.
218. Denisenko, T.V.; Sorokina, I.V.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: A link that must to be broken. *Drug Resist Updat* **2016**, *24*, 1-12, doi:10.1016/j.drug.2015.11.002.
219. Bernard, D.; Martinez-Leal, J.F.; Rizzo, S.; Martinez, D.; Hudson, D.; Visakorpi, T.; Peters, G.; Carnero, A.; Beach, D.; Gil, J. CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the Ink4a/Arf locus. *Oncogene* **2005**, *24*, 5543-5551, doi:10.1038/sj.onc.1208735.

220. Seoane, J.; Le, H.V.; Shen, L.; Anderson, S.A.; Massague, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **2004**, *117*, 211-223, doi:10.1016/s0092-8674(04)00298-3.
221. Liu, S.; Wang, X.; Zhao, Q.; Liu, S.; Zhang, H.; Shi, J.; Li, N.; Lei, X.; Zhao, H.; Deng, Z., et al. Senescence of human skin-derived precursors regulated by Akt-FOXO3-p27(KIP1)/p15(INK4b) signaling. *Cell Mol Life Sci* **2015**, *72*, 2949-2960, doi:10.1007/s00018-015-1877-3.
222. Bourgeois, B.; Madl, T. Regulation of cellular senescence via the FOXO4-p53 axis. *FEBS Lett* **2018**, *592*, 2083-2097, doi:10.1002/1873-3468.13057.
223. Shukla, S.; Shukla, M.; Maclennan, G.T.; Fu, P.; Gupta, S. Deregulation of FOXO3A during prostate cancer progression. *Int J Oncol* **2009**, *34*, 1613-1620, doi:10.3892/ijo_00000291.
224. Shukla, S.; Bhaskaran, N.; Maclennan, G.T.; Gupta, S. Deregulation of FoxO3a accelerates prostate cancer progression in TRAMP mice. *Prostate* **2013**, *73*, 1507-1517, doi:10.1002/pros.22698.
225. Zhang, H.; Pan, Y.; Zheng, L.; Choe, C.; Lindgren, B.; Jensen, E.D.; Westendorf, J.J.; Cheng, L.; Huang, H. FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res* **2011**, *71*, 3257-3267, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2603.
226. Qiu, X.; Dou, Y. miR-1307 promotes the proliferation of prostate cancer by targeting FOXO3A. *Biomed Pharmacother* **2017**, *88*, 430-435, doi:10.1016/j.biopha.2016.11.120.
227. Lv, Z.; Rao, P.; Li, W. MiR-592 represses FOXO3 expression and promotes the proliferation of prostate cancer cells. *Int J Clin Exp Med* **2015**, *8*, 15246-15253.

228. Park, S.H.; Jang, K.Y.; Kim, M.J.; Yoon, S.; Jo, Y.; Kwon, S.M.; Kim, K.M.; Kwon, K.S.; Kim, C.Y.; Woo, H.G. Tumor suppressive effect of PARP1 and FOXO3A in gastric cancers and its clinical implications. *Oncotarget* **2015**, *6*, 44819-44831, doi:10.18632/oncotarget.6264.
229. Huang, X.; Tran, T.; Zhang, L.; Hatcher, R.; Zhang, P. DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 1065-1070, doi:10.1073/pnas.0409130102.
230. Jividen, K.; Kedzierska, K.Z.; Yang, C.S.; Szlachta, K.; Ratan, A.; Paschal, B.M. Genomic analysis of DNA repair genes and androgen signaling in prostate cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 960, doi:10.1186/s12885-018-4848-x.
231. Terzi, M.Y.; Izmirli, M.; Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep* **2016**, *43*, 1213-1220, doi:10.1007/s11033-016-4065-0.
232. Yang, N.C.; Hu, M.L. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol* **2005**, *40*, 813-819, doi:10.1016/j.exger.2005.07.011.
233. Cho, S.; Hwang, E.S. Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Mol Cells* **2012**, *33*, 597-604, doi:10.1007/s10059-012-0042-1.
234. Blagosklonny, M.V. Rapamycin, proliferation and geroconversion to senescence. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 2655-2665, doi:10.1080/15384101.2018.1554781.
235. Zhang, J.; Huang, K.; O'Neill, K.L.; Pang, X.; Luo, X. Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2266, doi:10.1038/cddis.2016.167.
236. Kim, J.Y.; Chung, J.Y.; Lee, S.G.; Kim, Y.J.; Park, J.E.; Yun, J.; Park, Y.C.; Kim, B.G.; Yoo, Y.H.; Kim, J.M. p53 interferes with microtubule-stabilizing agent-induced apoptosis in prostate

and colorectal cancer cells. *Int J Mol Med* **2013**, *31*, 1388-1394, doi:10.3892/ijmm.2013.1333.

237. Supiot, S.; Hill, R.P.; Bristow, R.G. Nutlin-3 radiosensitizes hypoxic prostate cancer cells independent of p53. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 993-999, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0442.
238. Yang, M.C.; Lin, R.W.; Huang, S.B.; Huang, S.Y.; Chen, W.J.; Wang, S.; Hong, Y.R.; Wang, C. Bim directly antagonizes Bcl-xl in doxorubicin-induced prostate cancer cell apoptosis independently of p53. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 394-402, doi:10.1080/15384101.2015.1127470.
239. Gupta, K.; Thakur, V.S.; Bhaskaran, N.; Nawab, A.; Babcook, M.A.; Jackson, M.W.; Gupta, S. Green tea polyphenols induce p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer cells through two distinct mechanisms. *PLoS One* **2012**, *7*, e52572, doi:10.1371/journal.pone.0052572.
240. Bent, R.; Moll, L.; Grabbe, S.; Bros, M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19082155.
241. de Brot, S.; Ntekim, A.; Cardenas, R.; James, V.; Allegrucci, C.; Heery, D.M.; Bates, D.O.; Odum, N.; Persson, J.L.; Mongan, N.P. Regulation of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **2015**, *22*, R107-123, doi:10.1530/ERC-15-0123.
242. Ito, Y.; Ishiguro, H.; Kobayashi, N.; Hasumi, H.; Watanabe, M.; Yao, M.; Uemura, H. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate* **2015**, *75*, 1009-1019, doi:10.1002/pros.22972.
243. Kirkland, J.L.; Tchkonja, T.; Zhu, Y.; Niedernhofer, L.J.; Robbins, P.D. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc* **2017**, *10.1111/jgs.14969*, doi:10.1111/jgs.14969.

244. Tron, A.E.; Belmonte, M.A.; Adam, A.; Aquila, B.M.; Boise, L.H.; Chiarparin, E.; Cidado, J.; Embrey, K.J.; Gangl, E.; Gibbons, F.D., et al. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat Commun* **2018**, *9*, 5341, doi:10.1038/s41467-018-07551-w.
245. Chen, S.Y.; Liu, G.H.; Chao, W.Y.; Shi, C.S.; Lin, C.Y.; Lim, Y.P.; Lu, C.H.; Lai, P.Y.; Chen, H.R.; Lee, Y.R. Piperlongumine Suppresses Proliferation of Human Oral Squamous Cell Carcinoma through Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Senescence. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17040616.
246. Li, W.; Qin, L.; Feng, R.; Hu, G.; Sun, H.; He, Y.; Zhang, R. Emerging senolytic agents derived from natural products. *Mech Ageing Dev* **2019**, *181*, 1-6, doi:10.1016/j.mad.2019.05.001.
247. Li, Y.J.; Lei, Y.H.; Yao, N.; Wang, C.R.; Hu, N.; Ye, W.C.; Zhang, D.M.; Chen, Z.S. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer* **2017**, *36*, 52, doi:10.1186/s40880-017-0219-2.
248. Valenzuela, C.A.; Vargas, L.; Martinez, V.; Bravo, S.; Brown, N.E. Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Exp Cell Res* **2017**, *360*, 390-396, doi:10.1016/j.yexcr.2017.09.031.
249. Vijayaraghavan, S.; Karakas, C.; Doostan, I.; Chen, X.; Bui, T.; Yi, M.; Raghavendra, A.S.; Zhao, Y.; Bashour, S.I.; Ibrahim, N.K., et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15916, doi:10.1038/ncomms15916.
250. VanArsdale, T.; Boshoff, C.; Arndt, K.T.; Abraham, R.T. Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 2905-2910, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0816.

251. Burd, C.J.; Morey, L.M.; Knudsen, K.E. Androgen receptor corepressors and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **2006**, *13*, 979-994, doi:10.1677/erc.1.01115.
252. Kipps, T.J.; Eradat, H.; Grosicki, S.; Catalano, J.; Cosolo, W.; Dyagil, I.S.; Yalamanchili, S.; Chai, A.; Sahasranaman, S.; Punnoose, E., et al. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **2015**, *56*, 2826-2833, doi:10.3109/10428194.2015.1030638.
253. Cleary, J.M.; Lima, C.M.; Hurwitz, H.I.; Montero, A.J.; Franklin, C.; Yang, J.; Graham, A.; Busman, T.; Mabry, M.; Holen, K., et al. A phase I clinical trial of navitoclax, a targeted high-affinity Bcl-2 family inhibitor, in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* **2014**, *32*, 937-945, doi:10.1007/s10637-014-0110-9.
254. Levenson, J.D.; Phillips, D.C.; Mitten, M.J.; Boghaert, E.R.; Diaz, D.; Tahir, S.K.; Belmont, L.D.; Nimmer, P.; Xiao, Y.; Ma, X.M., et al. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci Transl Med* **2015**, *7*, 279ra240, doi:10.1126/scitranslmed.aaa4642.
255. Debrincat, M.A.; Pleines, I.; Lebois, M.; Lane, R.M.; Holmes, M.L.; Corbin, J.; Vandenberg, C.J.; Alexander, W.S.; Ng, A.P.; Strasser, A., et al. BCL-2 is dispensable for thrombopoiesis and platelet survival. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1721, doi:10.1038/cddis.2015.97.
256. Khan, S.; Zhang, X.; Lv, D.; Zhang, Q.; He, Y.; Zhang, P.; Liu, X.; Thummuri, D.; Yuan, Y.; Wiegand, J.S., et al. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat Med* **2019**, *25*, 1938-1947, doi:10.1038/s41591-019-0668-z.
257. Tai, S.; Sun, Y.; Squires, J.M.; Zhang, H.; Oh, W.K.; Liang, C.Z.; Huang, J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* **2011**, *71*, 1668-1679, doi:10.1002/pros.21383.

258. Nadal, R.; Schweizer, M.; Kryvenko, O.N.; Epstein, J.I.; Eisenberger, M.A. Small cell carcinoma of the prostate. *Nat Rev Urol* **2014**, *11*, 213-219, doi:10.1038/nrurol.2014.21.
259. Khullar, K.; Parikh, R.R. The role of radiotherapy in metastatic prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* **2019**, *7*, 92-97.
260. Shi, C.; Chen, X.; Tan, D. Development of patient-derived xenograft models of prostate cancer for maintaining tumor heterogeneity. *Transl Androl Urol* **2019**, *8*, 519-528, doi:10.21037/tau.2019.08.31.
261. Namekawa, T.; Ikeda, K.; Horie-Inoue, K.; Inoue, S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8010074.
262. Zhang, J.; Chen, L.; Zhang, J.; Wang, Y. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems. *Comput Struct Biotechnol J* **2019**, *17*, 1171-1177, doi:10.1016/j.csbj.2019.07.015.
263. Mauthe, M.; Orhon, I.; Rocchi, C.; Zhou, X.; Luhr, M.; Hijlkema, K.J.; Coppes, R.P.; Engedal, N.; Mari, M.; Reggiori, F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **2018**, *14*, 1435-1455, doi:10.1080/15548627.2018.1474314.
264. Sundelin, S.P.; Terman, A. Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS* **2002**, *110*, 481-489, doi:10.1034/j.1600-0463.2002.100606.x.
265. Moreno-Garcia, A.; Kun, A.; Calero, O.; Medina, M.; Calero, M. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci* **2018**, *12*, 464, doi:10.3389/fnins.2018.00464.

Annexe

Résultats préliminaires de l'étude du traitement des LNCaP à l'enzalutamide en combinaison avec la chloroquine.

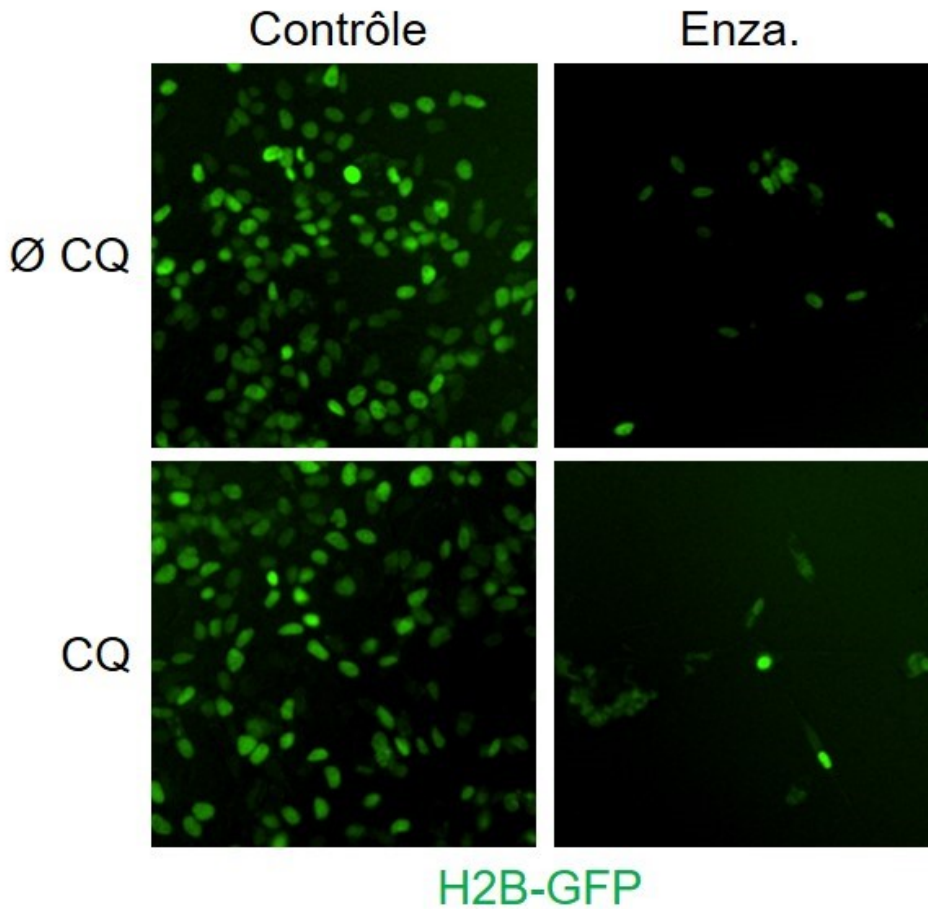


Figure : Les LNCaP traitées à l'enzalutamide en combinaison avec la chloroquine semblent **présenter une morphologie nucléaire altérée**. Les cellules LNCaP exprimant l'H2B-GFP ont été laissées sans traitement (gauche) ou traitées 36 jours à l'enzalutamide 10 μ M (droite), avec (bas) ou sans (haut) traitement à la chloroquine 12,5 μ M durant les 6 derniers jours de l'expérimentation. La fluorescence d'H2B-GFP est montrée en vert.